



Masteroppgave

Masterstudium i biomedisin

Mai 2021

Effekt av kortkjedede fettsyrer og forgreinede fettsyrer på energimetabolisme i skjelettmuskelceller

Siver Beajani
Kandidatnummer: 503
MABIO5900
60 studiepoeng

Fakultet for helsevitenskap
OSLO METROPOLITAN UNIVERSITY
STORBYUNIVERSITETET

**Effekt av kortkjedede fettsyrer og forgreinede
fettsyrer på energimetabolisme i
skjelettmuskelceller**

Siver Beajani
Veileder: Professor Vigdis Aas



Masterstudium i biomedisin
Masteroppgave, 60 sp
Fakultet for Helsevitenskap
Institutt for naturvitenskapelig helsefag
OsloMet-storbyuniversitet
Mai 2021

Forord

Denne oppgaven ble utført i perioden august 2020 til mai 2021 ved institutt for naturvitenskapelige helsefag, OsloMet-storbyuniversitet og på seksjon for farmakologi og farmasøytisk biovitenskap i gydas vei 8, Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo.

Jeg vil først og fremst rette en stor takk til min veileder, professor Vigdis Aas for meget godt oppfølging, veiledning og rådgivning gjennom hele masterperioden. Takk for at du var alltid tilgjengelig og ga tilbakemeldinger som var til stor hjelp.

Videre vil jeg takke medlemmer i «muskelbunten» ved Farmasøytisk institutt for interessante og lærerike tirsdagsmøter. Takk til Hege G. Bakke som hjulpet meg med PCR-forsøk og professor Arild C. Rustan for hjelp med TLC-forsøk.

Til slutt vil jeg takke min kjære familie for all støtte og motivasjon.

Gjerdrum, mai 2021

Siver Bejjani

Innholdsfortegnelse

Abstract	V
Sammendrag	VI
Forkortelser	VIII
1 Innledning	1
<i>1.1 Skjelettmuskel</i>	<i>1</i>
<i>1.2 Energimetabolisme i skjelettmuskel</i>	<i>2</i>
1.2.1 Glukosemetabolisme i skjelettmuskel.....	3
1.2.2 Fettsyremetabolisme i skjelettmuskel.....	7
<i>1.3 Metabolsk syndrom</i>	<i>9</i>
1.3.1 Overvekt og fedme	9
1.3.2 Insulinresistens og type 2-diabetes.....	10
<i>1.4 Tarmflora</i>	<i>10</i>
<i>1.5 Kortkjedede fettsyrer (SCFA)</i>	<i>11</i>
1.5.1 Produksjon av kortkjedede fettsyrer.....	11
1.5.2 Absorpsjon av kortkjedede fettsyrer	12
1.5.3 Effekter av kortkjedede fettsyrer (SCFA) på energimetabolisme.....	14
<i>1.6 Forgreinede fettsyrer (BCFA)</i>	<i>16</i>
<i>1.7 Hensikt og problemstillinger</i>	<i>18</i>
2 Materialer og metoder	19
2.1 Materialer	19
2.1.1 Kjemikalier og reagenser.....	19
2.1.2 Utstyr	21
2.2 Celler og donorkarakteristika	23
2.3 Etablering av cellebank.....	23
2.3.1 Oppskalering av celler	23
2.3.2 Nedfrysning av celler	24
2.4 Celledyrking.....	24
2.4.1 Utsåing av celler	24
2.4.2 Proliferasjon og differensiering	25
2.4.3 Forbehandling av myotuber før forsøk.....	25
2.5 Substratoksidasjonsmetoden	26
2.5.1 ¹⁴ CO ₂ trapping	27
2.5.2 Celleassosiert radioaktivitet	28
2.6 Bradford metode for å måle proteinkonsentrasjon	29

2.7 <i>Real-time RT-PCR</i>	30
2.7.1 <i>Høsting av celler til RT-PCR</i>	30
2.7.2 <i>RNA-isolering</i>	31
2.7.3 <i>Måling av RNA-konsentrasjon</i>	31
2.7.4 <i>cDNA-syntese</i>	32
2.7.5 <i>qPCR-kjøring</i>	32
2.8 <i>Kvantifisering av interleukin-6</i>	34
2.9 <i>Proteinmåling med Pierce</i>	35
2.10 <i>Proteinsyntese</i>	35
2.11 <i>Lipiddistribusjon</i>	36
2.12 <i>Statistikk</i>	37
3 Resultater	38
3.1 <i>Konsentrasjonsavhengige effekter av kortkjededede fettsyrer på energimetabolisme</i> ...	38
3.2 <i>Tidsavhengige effekter av kortkjededede fettsyrer på energimetabolisme</i>	41
3.3 <i>Effekt av forgrenede fettsyrer på energimetabolisme</i>	42
3.4 <i>Effekt av forbehandling med kortkjededede og forgrenede fettsyrer på insulin-stimulert glukoseopptak</i>	44
3.5 <i>Genekspresjon i skjelettmuskelceller etter forbehandling med kortkjededede og forgrenede fettsyrer</i>	46
3.6 <i>Myokinsekresjon fra skjelettmuskelceller etter forbehandling med kortkjededede og forgrenede fettsyrer</i>	47
3.7 <i>Proteinsyntese i skjelettmuskelceller etter forbehandling med kortkjededede og forgrenede fettsyrer</i>	48
3.8 <i>Effekt av forbehandling med forgrenede fettsyrer på ¹⁴C-leucin inkorporering i cellulære lipider</i>	50
4 Diskusjon	52
4.1 <i>Vurdering av metodikken</i>	52
4.2 <i>Effekter av kortkjededede og forgreinede fettsyrer på energimetabolisme</i>	53
4.3 <i>Andre effekter av kortkjededede og forgreinede fettsyrer på skjelettmuskelceller</i>	55
4.4 <i>Mulige mekanismer bak observerte effekter av kortkjededede og forgreinede fettsyrer</i> 56	
5 Konklusjon	57
Veien videre	58
Litteraturliste	59

Appendikser	67
<i>Appendiks I: Kopi fra REK godkjenning</i>	<i>.....</i>
<i>Appendiks II: Medier til celledyrkning.....</i>	<i>.....</i>
<i>Appendiks III: Stock-løsninger av kortkjedede fettsyrer og diverse løsninger</i>	<i>.....</i>
<i>Appendiks IV: Radioaktive medier brukt i substratoksidasjonsmetoden</i>	<i>.....</i>
<i>Appendiks V: Reaksjonsblanding for cDNA-syntese (per prøve).....</i>	<i>.....</i>
<i>Appendiks VII: Formler for beregning av relativ endring i genuttrykk</i>	<i>.....</i>

Abstract

Introduction: The connection between the gut microbiota and the aetiology of metabolic diseases as obesity and type 2-diabetes is increasingly being recognized. The gut microbiota might affect energy metabolism by fermenting indigestible dietary components and thereby producing short chain fatty acids (SCFA) as acetate, butyrate and propionate. These SCFA might enter the systemic circulation and directly affect metabolism of peripheral tissues. Branched chain fatty acid (BCFA) have recently been proposed as bioactive molecules contributing to the positive health effects associated with consumption of dairy products, but very little is known about possible effects on energy metabolism in skeletal muscle. Skeletal muscle might be an important site of action of SCFA and BCFA, yet relatively unexplored.

Methods: Satellite cells were isolated from muscle biopsies taken from *musculus vastus lateralis* from healthy voluntarily donors. The cells were cultured, proliferated and differentiated into multinuclear myotubes. During differentiation, the cells were pretreated with SCFA (acetate, butyrate and propionate) and BCFA (12-methyltetradecanic acid, 13-methyltetradecanic acid and 15-methylhexadecanoic acid). Glucose and lipid metabolism was studied using radiolabeled D-[^{14}C (U)] glucose and [^{14}C] oleic acid in substrate oxidation method. Gene expression of selected genes such as CYC1, UQCRB, GLUT1, CPT1B and CD36 were examined using reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Effect of SCFA and BCFA on interleukine-6 (IL-6) secretion was examined by using ELISA (Enzym-Linked Immunosorbent Assay). ^{14}C -leucine incorporation in proteins was used to study protein synthesis in skeletal muscle cells. Thin layer chromatography (TLC) was used to investigate the incorporation of ^{14}C -leucine into different cellular lipids after pretreatment with butyrate and BCFA.

Results/conclusion: The results showed increased oleic acid metabolism and glucose uptake in skeletal muscle cells after 24 hours pretreatment with butyrate 100 μM . As for BCFA, 12-MTA showed effect on glucose uptake without showing any effects on either glucose oxidation or oleic acid metabolism. SCFA and BCFA had no effects on either protein synthesis or IL-6 secretion from skeletal muscle cells. These fatty acid did not affect the expression of selected gene that are involved in energy metabolism. BCFA, especially 12-MTA and 13-MTA had an effect on incorporation of ^{14}C -leucine into cellular lipids in skeletal muscle cells.

Sammendrag

Innledning: I det siste har det vært stor fokus på sammenheng mellom tarmflora og etiologien av metabolske sykdommer som fedme og type 2-diabetes. Tarmflora kan spille en viktig rolle i energimetabolisme ved blant annet fermentering av ufordøyelige bestanddeler fra kosten og dermed produsere kortkjedede fettsyrer (SCFA) som acetat, butyrat og propionat. Disse fettsyrene kan transporteres over tarmveggen til blodbanen og ha direkte effekter på blant annet metabolisme i perifere vev. Forgreinete fettsyrer (BCFA) er nylig blitt sett på som bioaktive molekyler som bidrar med positive helseeffekter forbundet med inntak av meieriprodukter, men man vet veldig lite om mulige effekter på energimetabolisme i skjelettmuskel. Skjelettmuskel kan være et viktig virkningsområdet for kortkjedede og forgreinete fettsyrer som er lite forsket på.

Metoder: Satelittceller ble isolert fra muskelbiopsier tatt fra lårmuskulaturen (*m. vastus lateralis*) til friske frivillige donorer. Muskelcellene ble dyrket opp, proliferert og differensiert til flerkjernede myotuber. Under differensieringsperioden ble cellene forbehandlet med kortkjedede fettsyrer som acetat, butyrat og propionat, og forgreinete fettsyrer som 12-metyltetradekansyre (12-MTA), 13-metyltetradekansyre (13-MTA), 15-metylheksadekansyre (15-MHA). Glukose- og oljesyremetabolisme ble undersøkt ved bruk av substratoksidasjonsmetode, der radiomerket D-[¹⁴C(U)] glukose og [1-¹⁴C] oljesyre ble benyttet. Genuttrykk av utvalgte gener som CYC1, UQCRB, GLUT1, CPT1B og CD36 ble undersøkt ved å benytte revers-transkriptase kvantitativ polymerase-kjedereaksjon (RT-qPCR). Effekt av kortkjedede og forgreinete fettsyrer på interleukin-6 (IL-6) sekresjon ble studert ved bruk av ELISA (Enzym-Linked Immunosorbent Assay). Proteinsyntese i skjelettmuskelceller ble studert ved å undersøke ¹⁴C-leucin-inkorporering i proteiner. Tynnsjikt-kromatografi (TLC) ble brukt for å undersøke inkorporering av ¹⁴C-leucin inn i varierte lipidklasser etter forbehandling med butyrat og BCFA.

Resultater/konklusjon: Resultatene viste økt oljesyremetabolisme og glukoseopptak etter 24 timers forbehandling med butyrat 100 µM. Når det gjelder forgreinete fettsyrer så var det 12-MTA som viste effekt på glukoseopptak uten å ha noe effekt på verken glukoseoksidasjon eller oljesyremetabolisme. Kortkjedede og forgreinete fettsyrer hadde ingen effekt på verken proteinsyntese eller sekresjon av interleukin-6 (IL-6) fra skjelettmuskelceller. Disse fettsyrer påvirket heller ikke uttrykk av utvalgte, relevante gener involvert i energimetabolisme. Forgreinete fettsyrer, særlig 12-MTA og 13-MTA hadde effekt på inkorporering av ¹⁴C-leucin i cellulære lipider i skjelettmuskelceller.

Forkortelser

ATP	Adenosintrifosfat
ADP	Adenosindifosfat
Acetyl-CoA	Acetyl koenzym A
ACS	Acyl-CoA-syntase
ACBP	Acyl-CoA bindende protein
ATGL	Fettvev triglyseridlipase
AC	Adenylyl syklase
AS160	Akt-substrat 160 kDa
AMPK	AMP-aktivert protein kinase
BCAA	Forgreinede aminosyrer
BCAT	Forgreinede aminosyrer transferase
BKD	Forgrenet- α -ketosyre dehydrogenase
BCFA	Forgreinede fettsyrer
BSA	Bovint serumalbumin
CaMK	Ca ²⁺ /kalmmodulin-avhengig protein kinase
Cyt c	Cytokrom c
CPT	Karnitin-palmitoyltransferase
CRAT	Karnitin acetyltransferase
CD36/FAT	Blodplate glykoprotein 4/ fettsyretranslokase
CO ₂	Karbondioksid
cAMP	Syklisk AMP
DAG	Diacylglycerol
DGAT	Diacylglycerol acyltransferase
DMSO	Dimetylsulfoksid
ER	Endoplasmatisk retikulum
ECM	Ekstracellulær matriksgel
FADH ₂	Flavin-adenin-dinukleotid
FFA	Frie fettsyrer
FABP	Fettsyrebindende proteiner
FATP4	Fettsyretransportprotein 4
Ffar	Frie fettsyrer reseptor
FASN	Fettsyre-syntase

FXR	Farnesoid X reseptor
FCS	Føtalt kalveserum
GTP	Guanosintrifosfat
GLUT4	Glukosetransportør 4
GLUT1	Glukosetransportør 1
GS	Glykogensyntase
GPAT	Glyserol-3-fosfat acyltransferase
GLP-1	Glukagonlignende peptid
GPR	G-protein koblede reseptor
HK	Heksokinase
HSL	Hormonsensitiv lipase
HDL	Høy-tetthet-lipoprotein
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
IR	Insulinreseptor
IRS	Insulinreseptorsubstrat
IP ₃	Inositol trifosfat
IMTG	Intramuskulære triglyserider
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
KMI	Kroppsmasseindeks
LXR	Lever X reseptor
MGL	Monoglyserid lipase
MCT	Monokarboksylat-transportere
MGWAS	Metagenome-wide association studies
NADH	Nikotin-adenin-dinukleotid
OXPPOS	Oksidativ fosforylering
PI3K	Fosfatidylinositol 3-kinase
PIP ₃	Fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfat
PIP ₂	Fosfatidylinositol 4,5-bifosfat
P _i	Inoganisk fosfor
PDK-1	Fosfoinositid-avhengig kinase-1
PKB	Protein kinase B
PL	Fosfolipider
PGC1 _α	Peroksisom proliferator-aktivert reseptor gamma koaktivator

PPAR	Peroksisom proliferator-aktivert reseptorer
PEP	Fosfoenolpyruvat
PYY	Polypeptid YY
PKC	Protein kinase C
PKA	Protein kinase A
PDH	Pyruvat dihydrogenase
PBS	Fosfatbufret saltvann
qPCR	Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon
RTK	Reseptortyrosinkinaser
REK	Regional etisk komite
RPLP0	Syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0
SR	Sarkoplasmatisk retikulum
SCFA	Kortkjededede fettsyrer
SMCT1	Natrium-avhengig monokarboksylat-transporter
SDS	Natriumdedocylsulfat
TAG	Triacylglyserol
TCA	Triklorrediksyre
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VLDL	Meget-lav-tetthet lipoprotein
WHO	Verdens helseorganisasjon
12-MTA	12-metyltetradekonat
13-MTA	13- metyltetradekonat
15-MHA	15-metyltetradekonat

1 Innledning

1.1 Skjelettmuskel

Skjelettmuskel er den viljestyrte muskeltypen som utgjør ca. 80 % av kroppens muskelvev. Den er fordelt på ca. 600 muskler, der hver muskel er bygd opp av muskelceller (muskelfibrer), blodårer, nettverk av nerver og bindevev som binder de enkelte muskelfibrene sammen i muskelbunter [1-3]. Skjelettmuskelceller har mange cellekjerner som er jevnt fordelt langs muskelfibrene. Hver muskelfiber inneholder mange myofibriller som igjen består av parallelle myofilamenter. Det er to typer myofilamenter, de tynne (aktin) og de tykke (myosin), som er dannet ved systematisk arrangering/strukturering av proteinene aktin og myosin. Når disse myofilamentene er samlet formerer de sarkomerer, som er de minste funksjonelle enhetene i muskelfiberen. Når disse filamentene interagerer fører det til sammentrekning av muskelen i en adenosintrifosfat (ATP)-avhengig prosess som respons på nervesignaler [2, 3]. Hver muskelfiber er omsluttet av en tynn bindevevshinne (endomysium). Grupper av muskelfibrer er ordnet i bunter og omgitt av en tykkere bindevevshinne (perimysium). Selve muskelen som er dannet av mange muskelfiberbunter er omsluttet av en felles bindevevshinne (epimysium) [1, 3].

Skjelettmuskel inneholder flere typer muskelfibre, klassifisert vanligvis som type I (oksidative/langsomme) eller type II (raske). Type-I fibrer inneholder et høyt antall mitokondrier og bruker oksidativ fosforylering til sin ATP-produksjon, noe som gir en stabil og langvarig tilførsel av ATP. Derfor er disse fibrene utholdende, oksidative og langsomme [1, 2, 4]. Type-II fibrer deles inn i tre subenheter, IIa, IIx og IIb, hvorav type IIb inneholder laveste nivåer av mitokondrier og oksidative enzymer og er derfor avhengig av glykolytisk metabolisme for produksjon av ATP. Egenskaper til type IIa og IIx ligger et sted mellom type I og type IIb fibre når det gjelder oksidasjon- og kontraksjonsfunksjoner. Type IIa er raske, oksidative fibre mens IIx er raske, glykolytiske fibre med minst utholdenhet [3, 4].

Sammensetning av fibertyper i skjelettmuskel er dynamisk og kan endres gjennom livet [2]. Studier viser at spesifikasjoner på muskelfiber ser ut til å være assosiert med fedme og type 2-diabetes. Det er blant annet observert lavere nivåer av type I fibre hos personer med fedme og diabetes [5, 6].

Skjelettmuskel inneholder også satellittceller, primære stamceller som spiller en viktig rolle i vekst og regenerering av vev. De er udifferensierte celler som vanligvis er i hvilende status hos voksne, men blir aktivert av myogene faktorer som respons på muskelvekst eller skade. Etter aktivering vil satellittceller fusjonere med eksisterende muskelfibre og bidra til vekst eller reparasjon av skadede fibre [1, 2, 7]. Satellittceller kan bli isolert fra skjelettmuskelbiopsier, så aktivert til prolifererende myoblaster, som videre differensieres til flerkjernede myotuber i kultur. Myotuber i kultur har liknende egenskaper som skjelettmuskel *in vivo* og er derfor en velegnet *in vitro*-modell for studier av human skjelettmuskulatur [7, 8]. I denne masteroppgaven ble det brukt satellittceller med humant opphav, der biopsier ble tatt fra lårmuskulaturen (*m. vastus lateralis*). Det ble brukt en modifisert protokoll etablert av Gaster et al. for isolering og dyrkning av muskelceller i kultur [9].

1.2 Energimetabolisme i skjelettmuskel

Skjelettmuskel regnes som kroppens største organ som utgjør omtrent 40 % av total kroppsmasse, 30 % av hvilende energiforbruk og inntil 80 % av insulinstimulert glukoseopptak [1, 10]. Energimetabolisme i skjelettmuskel vil dermed kunne påvirke energibalansen for hele organismen. Fra et mekanisk perspektiv er hovedfunksjonen til skjelettmuskulaturen å konvertere kjemisk energi til mekanisk energi for å generere blant annet kraft til bevegelse, mens fra et metabolsk perspektiv er rollen til skjelettmuskulaturen å bidra til basal energimetabolisme. Skjelettmuskulaturen bidrar også til varmeutvikling som vil være hensiktsmessig for blant annet å opprettholde kjernetemperatur [1, 11].

Skjelettmuskulaturen er det vevet som er mest involvert i lipid- og glukoseomsetning i kroppen. Der lipider er primære kilder til energiproduksjon ved faste og vedvarende fysisk aktivitet, mens glukose blir foretrukket som primær energikilde ved matinntak, altså under insulin-stimulerte forhold [12].

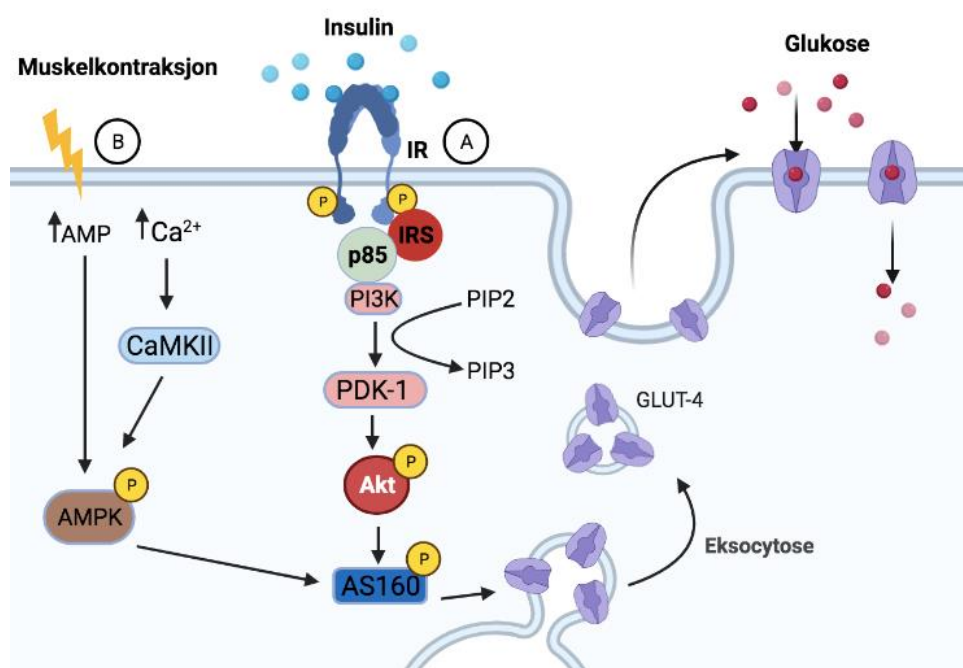
1.2.1 Glukosemetabolisme i skjelettmuskel

Insulin fungerer som en primær regulator av glukosekonsentrasjon i plasma ved at det øker glukoseopptak i både muskel og fettvev og hemmer glukoseproduksjon og -frigjøring fra leveren. Insulin kan i tillegg føre til dannelse og lagring av triglyserider og glykogen i fettvev, lever og muskel ved å stimulere lipogenese, glykogensyntese og hemme lipolyse og glykogenolyse. En viktig del av kroppens evne til å opprettholde glukosebalansen etter måltid er insulin-stimulert glukoseopptak [13, 14].

Glukosetransport i skjelettmuskel er mediert ved fasilitet diffusjon gjennom bestemte glukosetransportører (GLUT). Til nå er det identifisert 15 isoformer av GLUT-familien, der minst 5 av dem er uttrykt i skjelettmuskel (GLUT1, 4, 5, 8 og 11) [15]. GLUT1 og GLUT4 har vist seg å ha størst betydning for glukosetransport inn i skjelettmuskelceller [14]. GLUT1 er uttrykt i nesten alle vev og er ansvarlig for basalt glukoseopptak, mens GLUT4 finnes hovedsakelig i fettvev og muskel og er ansvarlig for insulin-stimulert glukoseopptak [16].

Insulin-stimulert glukoseopptak i muskel og fettvev skjer gjennom en kompleks signaliseringskaskade. Insulin utfører denne effekten ved at det bindes til insulinreseptor (IR) og videre stimulerer translokasjon av GLUT4 fra intracellulære lagringssteder til plasmamembranen. Translokasjon av GLUT4 er det hastighetsbestemmende trinnet i insulin-stimulert glukoseopptak i både muskel og fettvev [13, 16]. Insulinreseptoren er et heterotetramerisk membranprotein som tilhører reseptortyrosinkinaser (RTK). Denne reseptoren består av to α - og to β -subenheter, hvorav insulin bindes til α -subenhet og videre aktiverer β -subenheten (figur 1.1). Dette resulterer i autofosforylering som fører til aktivering av insulinreseptoren, slik at insulinreseptorsubstrat (IRS) kan bindes til reseptoren og fosforyleres [13]. IRS vil kunne fungere som bindingssete for signalproteiner som p85, en regulatorisk subenhet av fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K). Dette medfører aktivering av enzymet og generering av fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfat (PIP₃) fra fosfatidylinositol 4,5-bifosfat (PIP₂). Dette fører til rekruttering og aktivering av blant annet fosfoinositid-avhengig kinase-1 (PDK-1) som vil videre aktivere nedstrøms aktivatorer som protein kinase B (PKB), også kjent som Akt. Aktivert Akt vil videre fosforylere akt-substrat 160 kDa (AS160) som blir inaktivert, slik at Rab-proteiner ikke blir inaktiverte lenger og tillater translokasjon av GLUT4 fra intracellulære vesikler til cellemembranen (figur 1.1) [17].

Fysisk aktivitet kan også stimulere translokasjon av GLUT4 fra intracellulære vesikler til cellemembranen og dermed øke glukoseopptak. En mekanisme bak dette kan være at ved energiforbruk, som ved trening, økes nivået av AMP og ADP i forhold til ATP. Dette kan føre til aktivering av AMP-aktivert protein kinase (AMPK), som kan ha flere oppgaver i cellen, blant annet direkte fosforylering av AS160, som er sentralt for glukoseopptak ved insulinsignalisering. Aktivering av AMPK kan også skje ved at muskelkontraksjon fører til frigjøring av Ca^{2+} fra sarkoplasmatiske retikulum (SR), noe som bidrar til aktivering av Ca^{2+} /kalmodulin-avhengig protein kinase (CaMK) familien, særlig CaMKII som kan videre fosforylere og aktivere AMPK (figur 1.1) [18, 19].



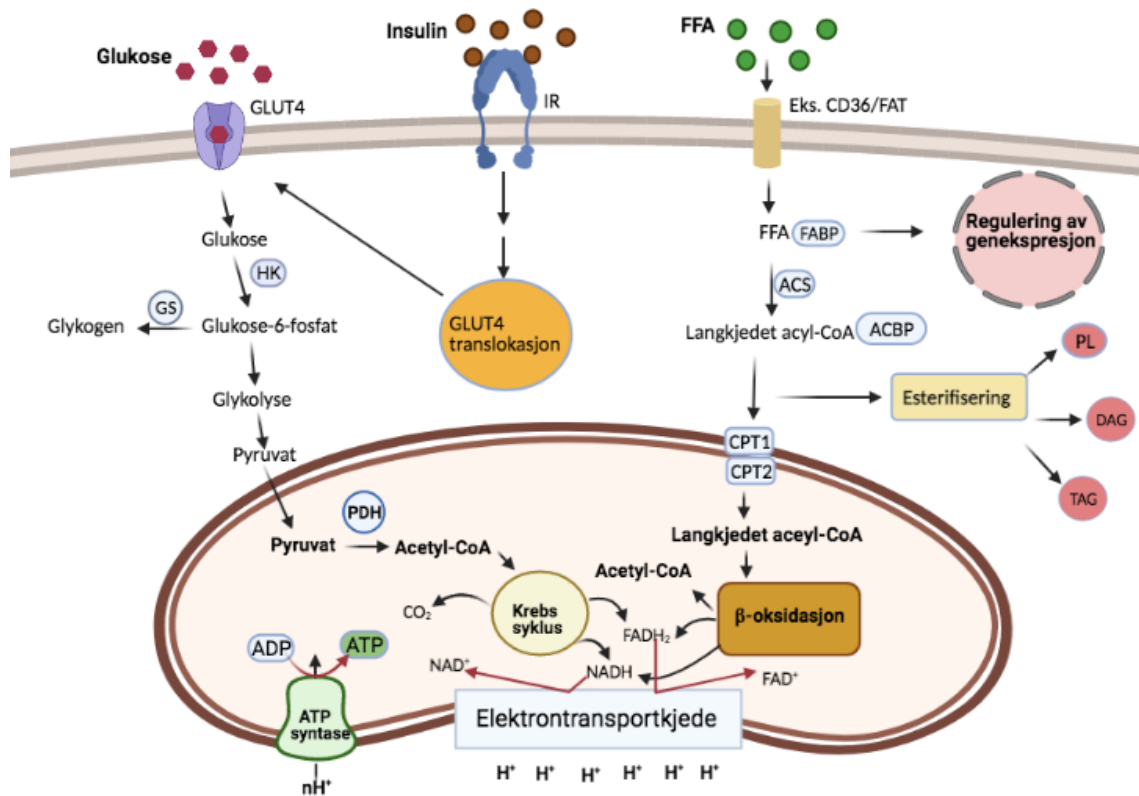
Figur 1.1: Glukosetransportør 4 (GLUT4)-translokasjon via en kompleks signaliseringskaskade.

A: Binding av insulin til insulinreseptoren (IR) utløser en autofosforylering av reseptoren og muliggjør binding av insulinreseptorsubstrat (IRS). Fosforylert IRS vil kunne fungere som bindingssete for p85 signalprotein, noe som fører til aktivering av fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K) og dermed generering av fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfat (PIP_3) fra fosfatidylinositol 4,5-bifosfat (PIP_2). Dette fører til rekruttering og aktivering av blant annet fosfoinositid-avhengig kinase-1 (PDK-1), som vil fosforylere Akt som videre fosforylerer og inaktiverer akt-substrat 160 kDa (AS160). Dette resulterer i translokasjon av GLUT4 fra intracellulære vesikler til cellemembranen.

B: Muskelkontraksjon medfører aktivering av AMP-avhengig kinase (AMPK) via frigjøring av Ca^{2+} fra sarkoplasmatiske retikulum (SR), noe som bidrar til aktivering av Ca^{2+} /kalmodulin-avhengig protein kinase (CaMK) familien, særlig CaMKII. CaMKII aktiverer AMPK som videre fører til fosforylering av AS160, og dermed translokasjon av GLUT4. Modifisert fra [13, 16, 18, 20].

Etter at glukose er tatt inn i cellens cytosol, blir det fosforylert til glukose-6-fosfat ved hjelp av enzymet heksokinase (HK). Glukose-6-fosfat kan enten gå gjennom glykolysen, eller blir lagret som glykogen ved glykogensyntesen (figur 1.2). Glykolyse er en prosess med flere trinn som resulterer i nedbrytning av glukose-6-fosfat til pyruvat og dannelse av nikotin-adenin-dinukleotid (NADH) og adenosintrifosfat (ATP). Ved utilstrekkelig tilgang på oksygen kan pyruvat omdannes anaerobt til laktat mens under aerobe forhold tas pyruvat opp i mitokondriell matriks ved hjelp av spesifikke transportere og blir konvertert til acetyl-CoA ved hjelp av PDH-komplekset (pyruvat dihydrogenase) (figur 1.2). Acetyl-CoA går videre gjennom Krebs syklus, også kalt sitronsyresyklusen. Det er en serie av kjemiske reaksjoner hvor acetyl-gruppen fra acetyl-CoA blir omdannet til oksaloacetat og deretter oksidert til sitronsyre. Fra en syklus dannes det to karbondioksid (CO_2)-molekyler, i tillegg til høyenergibærere i form av (NADH), flavin-adenin-dinukleotid (FADH_2) og guanosintrifosfat (GTP). NADH og FADH_2 som dannes fra Krebs syklus og β -oksidasjon kan overføre høyenergielektroner til elektrontransportkjeden som er lokalisert i den indre mitokodriemembranen. Elektrontransportkjeden er sammensatt av fire proteinkomplekser (I-IV) og andre elektronbærere som cytokrom C (cyt c) og ubikinon (koenzym Q). Elektroner kan overføres mellom elektronbærere og avgi fri energi som brukes til å bevege protoner over den indre mitokondriemembranen. Dette fører til dannelse av en protongradient som driver dannelse av ATP fra ADP og fosfat (P_i) ved hjelp av enzymet ATP-syntase. Koblingen mellom elektrontransportkjede med ATP-syntase kalles oksidativ fosforylering (OXPHOS) (figur 1.2) [21-24].

Ved overskudd av energi i cellene vil glukose-6-fosfat omdannes til glykogen ved hjelp av enzymet glykogensyntase (GS). På denne måten blir glukose lagret i form av glykogen, som senere kan spaltes til glukose-1-fosfat og undergå glykolyse ved behov for energi. Hovedlager for glykogen befinner seg i skjelettmuskel og lever, mens andre celler lagrer mindre mengder glykogen for dere eget bruk. Glykogen i muskel har som funksjon å syntetisere ATP under muskelkontraksjon, mens glykogen i lever opprettholder glukose konsentrasjon i blod, spesielt ved faste [21].



Figur 1.2: Metabolisme av glukose og frie fettsyrer (FFA) i skjelettmuskel. Skjelettmuskel benytter både glukose og FFA til sin energiproduksjon, hvorav begge gjennomgår en rekke prosesser før det dannes energi i form av adenosintrifosfat (ATP). GLUT4, glukosetransportør 4; HK, heksokinase; GS, glykogensyntase; PDH, pyruvat dehydrogenase; NADH/NAD⁺, nikotin-adenin-dinukleotid; FADH₂/FAD⁺, flavin-adenin-dinukleotid; IR, insulinreseptor; CPT1, karnitin-palmitoyltransferase-1; CPT2, karnitin-palmitoyltransferase-2; CD36/FAT, blodplate glykoprotein 4/ fettsyretranslokase; acetyl-CoA, acetyl koenzym A; ACS, acyl-CoA-syntase; FABP, fettsyrebindende proteiner; ACBP, acyl-CoA bindende protein; PL, fosfolipider; TG, triglyserider; DAG, diglyserider; ADP, adenosindifosfat. Modifisert fra [13, 16, 20, 25, 26].

1.2.2 Fettsyremetabolisme i skjelettmuskel

Frie fettsyrer (FFA) kan tas opp i skjelettmuskelceller ved fasilitert diffusjon ved hjelp av transportproteiner i cellemembranen. Det er blitt funnet flere fettsyretransportere i skjelettmuskel, som CD36/FAT (blodplate-glykoprotein 4/ fettsyretranslokase), plasmamembran-bundet fettsyrebindende protein (FABP_{pm}) og fettsyretransportproteiner (FATP) 1 og 4, der CD36/FAT og FATP4 har vist seg å være de mest effektive fettsyretransporterne [26, 27]. Muskelkontraksjon og insulin kan øke opptak av FFA ved å indusere translokasjon av CD36/FAT transporter fra intracellulære lagre til cellemembranen [26, 28].

Inne i cellen kan FFA transporteres ved hjelp av fettsyrebindende proteiner (FABP). FFA metaboliseres i mitokondrier ved såkalt β -oksidasjon og må derfor transporteres fra cytosol over mitokondriemembranen og til mitokondriell matriks. Først blir FFA esterifisert til langkjedet acyl-CoA av acyl-CoA-syntase (ACS) i cytosol, hvorav mesteparten blir transportert ved hjelp av acyl-CoA bindende protein (ACBP) til mitokondrier og peroksisomer for β -oksidasjon, mens en liten andel kan bli konvertert til intracellulære lipider som fosfolipider (PL), triglyserider (TAG), diglyserider (DAG) og ceramider i endoplasmatisk retikulum (ER) [25]. FFA eller acyl-CoA kan også bindes til transkripsjonsfaktorer, som f.eks. peroksisom proliferator-aktiverte reseptorer (PPAR) og regulere genekspressjon (figur 1.2) [29].

Langkjedet acyl-CoA blir transportert inn i mitokondrier ved en bæremekanisme, bundet til karnitin. I den ytre mitokondriemembranen sitter enzymet karnitin-palmitoyltransferase-1 (CPT1) som kobler acyl-gruppen til karnitin, slik at den transporteres over membranen inn i mitokondriell matriks. Inne i matriks omdannes acylkarnitin tilbake til langkjedet acyl-CoA av karnitin-palmitoyltransferase-2 (CPT2) som overfører acyl-gruppen til CoA igjen samtidig som karnitin frigjøres [21].

CPT1-aktivitet er viktig for fettsyreoksidasjon siden det er det hastighetsbestemmende enzymet for opptak av langkjedet acyl-CoA til mitokondrier [30]. Acyl-CoA er utgangspunktet for nedbrytning av FFA ved β -oksidasjon, hvorav acyl-CoA degraderes til acetyl-CoA ved en syklisk prosess der acyl-CoA hver gang forkortes med to karbonatomer. Dette resulterer i dannelsen av acetyl-CoA og høyenergibærere som nikotin-adenin-dinukleotid

(NADH) og flavin-adenin-dinukleotid (FADH₂). Acetyl-CoA kan videre gå inn Krebs syklus på samme måte som acetyl-CoA dannet fra glukosemetabolisme og inngå i dannelse av ATP (avsnitt 1.2.1) [22].

Skjelettmuskel kan få tilført fettsyrer fra flere kilder, blant annet FFA bundet til albumin fra lipolyse i fettvevet ved hjelp av hormonsensitiv lipase (HSL), og FFA frigjort fra triglyserider (TG) etter hydrolyse av sirkulerende kylomikroner og VLDL (meget-lav-tetthet lipoprotein) i blodet, ved hjelp av lipoprotein lipase (LPL). I skjelettmuskel kan acyl-CoA lagres i form av intramuskulære triglyserider (IMTG) ved blant annet energioverskudd. Dette skjer i en rekke enzymatiske trinn, hvorav glyserol-3-fosfat acyltransferase (GPAT) katalyserer første trinn og diacylglyserol acyltransferase (DGAT) katalyserer siste trinn i TG syntese [20].

Intramuskulære triglyserider (IMTG) i skjelettmuskel kan da også spaltes og fungere som kilde til FFA [21, 25, 31]. Monoglyserid lipase (MGL), fettvev triglyseridlipase (ATGL) og hormon sensitiv lipase (HSL) er enzymer som kan være involvert i lipolyse av IMTG til FFA [31].

1.3 Metabolsk syndrom

Metabolsk syndrom er et samlebegrep for metabolske risikofaktorer som predisponerer for metabolske sykdommer, som type 2-diabetes og kardiovaskulære sykdommer. De metabolske risikofaktorene omfatter abdominal fedme, aterogen dyslipidemi, hypertensjon, insulinresistens både med og uten glukoseintoleranse, en proinflammatorisk og protrombotisk tilstand [32]. Metabolsk syndrom utvikles gradvis over tid og blir drevet av en kompleks kombinasjon av faktorer, inkludert lipidakkumulering, redusert insulin sensitivitet og immunitet [33].

1.3.1 Overvekt og fedme

Overvekt og fedme defineres som unormal eller overflødig fettakkumulering, som kan øke risikoen for flere sykdommer, blant annet kardiovaskulære sykdommer, type-2 diabetes og kreft [34]. Verdens helseorganisasjon (WHO) har klassifisert overvekt og fedme ved å bruke kroppsmasseindeks (KMI), hvorav overvekt er en KMI på 25 eller over og fedme er en KMI på 30 eller over. KMI definert som kroppsvekt i kilogram per kvadrat av høyden i meter (kg/m^2) [35]. Forekomsten av overvekt og fedme har økt over hele verden siden 1970-tallet, og i 2016 var omtrent 40 % av voksne og 18 % av barn (alder 5-19 år) overvektige blant hele verdens befolkning [36].

Overvekt og fedme skyldes en ubalanse mellom energiinntak og energiforbruk. Utbruddet av fedme er en kompleks prosess som involverer genetiske, psykiske, hormonelle og miljømessige faktorer, og er ofte assosiert med flere kroniske komplikasjoner, som hyperglykemi, hypertriglyseridemi, lave nivåer av HDL (høy-tetthet-lipoprotein) og hypertensjon [37]. Det har blitt foreslått at redusert fetttsyreoksidasjon i forhold til glukoseoksidasjon kan være en mulig faktor til vektøkning og at endret fetttsyremetabolisme kan være viktig i patogenesen av fedme [38]. Fedme blir assosiert med blant annet økt risiko for utvikling av insulinresistens og type 2-diabetes. Dette kan da skyldes blant annet økt frigjøring av FFA, glyserol, hormoner og proinflammatoriske cytokiner fra fettvev [39].

1.3.2 Insulinresistens og type 2-diabetes

Insulinresistens oppstår når det er en redusert respons på normale nivåer av sirkulerende insulin, inkludert en reduksjon i insulin-stimulert glukoseopptak [25]. Skjelettmuskel er særlig viktig i denne sammenhengen siden det står for inntil 80 % av insulin-stimulert glukoseopptak. Langvarig insulinresistens er en av de viktigste årsakene til utvikling av type 2-diabetes [10, 33].

Utvikling av insulinresistens og type 2-diabetes er en kompleks prosess som kan ha sterk sammenheng med fedme og antakeligvis tilstedeværelse av en kronisk inflammasjonstilstand. Kronisk inflammasjon er preget av unormal ekspresjon og produksjon av en rekke pro-inflammatoriske cytokiner som tumornekrosefaktor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1) og interleukin-6 (IL-6) som medierer insulinresistens i perifere vev [40, 41].

Lipidakkumuleringen som oppstår ved ubalanse mellom opptak og oksidasjon av fettsyrer kan også være en mulig årsak til insulinresistens [42, 43]. Høye nivåer av sirkulerende FFA og akkumulering av langkjedet acyl-CoA og triglyserider i muskel kan bidra til utvikling av insulinresistens i skjelettmuskulatur ved å redusere Akt-aktivitet og dermed føre til mindre translokasjon av GLUT4 til cellemembranen. Mitokondriell dysfunksjon, altså defekt i mitokondriell oksidativ fosforylering kan også være med på utvikling av insulinresistens [44].

1.4 Tarmflora

I løpet av de siste årene har det vært stor fokus på betydning av tarmflora ved fedme og type 2-diabetes. Det er vist at overføring av tarmflora fra tynne personer til personer med fedme og metabolsk syndrom forbedret insulinsensitivitet og økte andel butyratproduserende bakterier i tarmen [45, 46]. Studier som undersøkte hele tarmfloraens gensammensetning, såkalte «metagenome-wide association studies» (MGWAS) viste at tarmfloraen hos voksne personer med type 2-diabetes er forskjellige fra personer uten diabetes og at de med type 2-diabetes har lavere andel av butyratproduserende bakterier [40, 47-49]. Tarmflora kan virke som et metabolskt organ ved å nedbryte ufordøyelige bestanddeler fra kosten, noe som resulterer i produksjon av kortkjedede fettsyrer (SCFA) som acetat, butyrat og propionat. Disse SCFA kan ha en viktig rolle i patofysiologien av fedme, insulinresistens og type 2-diabetes ved å regulere energimetabolisme [45]. Sammensetning av tarmflora er en avgjørende faktor for dannelse av SCFA og blir påvirket av blant annet kosthold [50].

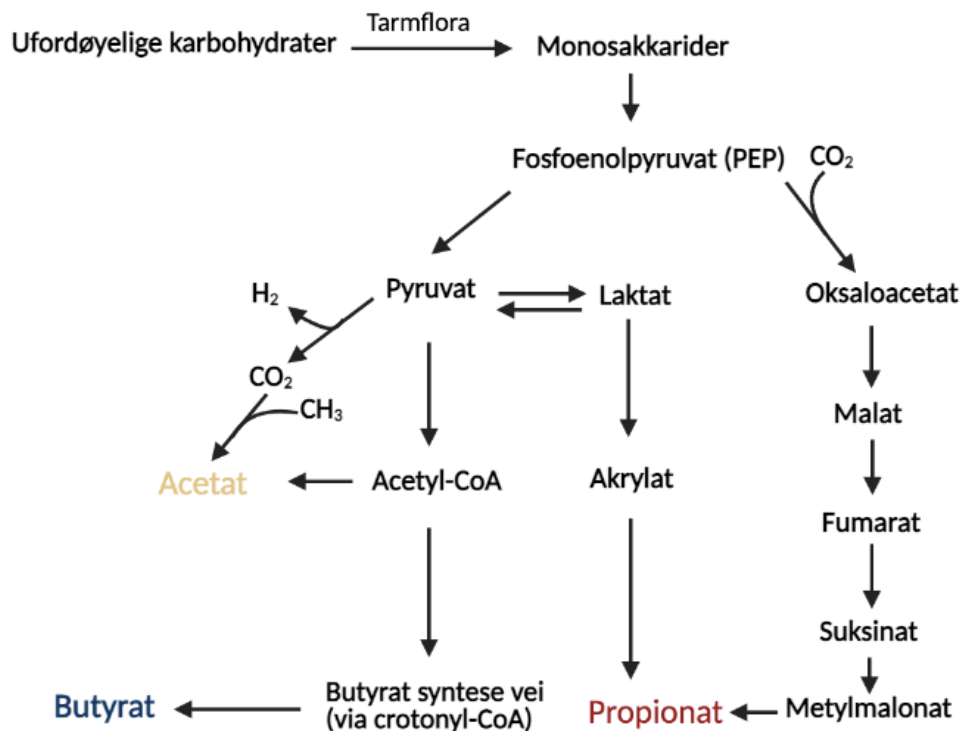
1.5 Kortkjedede fettsyrer (SCFA)

Tarmflora har blitt anerkjent som en viktig miljøfaktor for utvikling av metabolske sykdommer, som fedme, type 2-diabetes og kardiovaskulære sykdommer [37]. Tarmfloraen kan produsere farmakologisk aktive signaliseringsmolekyler som kan påvirke metabolisme i vertsceller, slike som kortkjedede fettsyrer (SCFA=Short Chain Fatty Acid). Disse er fettsyrer med 1-6 mettede karbonatomer i sin struktur som produseres ved bakteriell fermentering av plantefibre i tykktarmen. De vanligste typer kortkjedede fettsyrer som dannes i cecum og colon er acetat (eddiksyre), butyrat (smørsyre) og propionat (propansyre). Disse utgjør >95 % av total mengde SCFA i tarmen [33, 45, 50].

1.5.1 Produksjon av kortkjedede fettsyrer

Produksjon av kortkjedede fettsyrer i tykktarmen skjer via bakteriell fermentering av kostfibrer, en prosess som innebærer at bakteriene metaboliserer ufordøyelige bestanddeler fra kosten, som kostfibre i fravær av oksygen (anaerobt). Acetat lages av de fleste bakteriene i tarmen, mens butyrat produseres av Clostridia, en klasse av Firmicutes bakteriefamilien, og propionat blir produsert av Bacteroidetes og Negativicutes [45, 51].

Ufordøyelige karbohydrater fra kosten blir først nedbrutt til monosakkarider som videre fermenteres av bakterier i det anaerobe miljøet i tarmen. De fleste bakteriene konverterer monosakkarider til fosfoenolpyruvat (PEP), som omdannes til enten pyruvat eller okasaloacetat, og videre til fermenteringsprodukter som organiske syrer og alkoholer (figur 1.3) [50]. Acetat blir dannet enten ved hydrolyse av acetyl-CoA eller ved at CO₂ blir redusert til CO og sammen med en metylgruppe og CoA danner acetyl-CoA (figur 1.3). Propionat kan dannes ved at pyruvat blir omdannet til laktat, så til akrylat og videre redusert til propionat. Dannelse av propionat kan også skje via suksinatdekarboksylingsvei, hvorav fosfoenolpyruvat (PEP) sammen med CO₂ går gjennom flere trinn og blir omdannet til propionat. Butyratdannelse starter med kondensering av to acetyl-CoA molekyler som blir redusert til mellomproduktet crotonyl-CoA, så butyryl-CoA og videre omdannet til butyrat (figur 1.3) [10, 50].



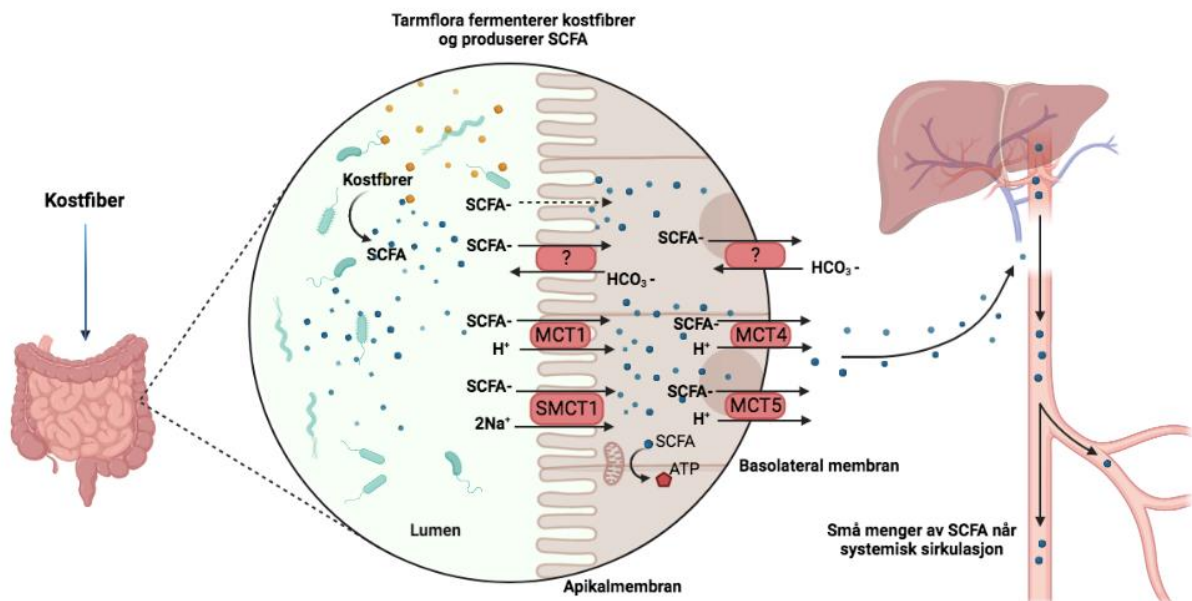
Figur 1.3: Skjematisk oversikt over metabolske veier involvert i tarmfloraens produksjon av kortkjedede fettsyrer (SCFA). I tarmlumen blir ufordøyelige karbohydrater nedbrutt av bakterier til monosakkarider, som videre gjennomgår bakteriell fermentering via ulike metabolske veier. Dette medfører produksjon av de vanligste typer kortkjedede fettsyrer som acetat, butyrat og propionat. modifisert fra [10, 50].

1.5.2 Absorpsjon av kortkjedede fettsyrer

Kortkjedede fettsyrer (SCFA) kan brukes enten som energikilde for tarmcellene (særlig butyrat) og/eller transporteres over tarmveggen til blodbanen og antageligvis fungere som signalmolekyler og energikilder/byggesteiner for resten av kroppen. I cecum og colon, blir ca. 95 % av produserte SCFA absorbert av kolonocytter mens det resterende 5 % blir skilt ut i avføring [50].

SCFA kan bli absorbert gjennom apikal og basolateralt membranen av kolonocytter (tarmceller). For opptak til den apikale membranen er det blitt foreslått flere mulige mekanismer. Den ene er passiv diffusjon av ikke-ioniserte SCFA. Den andre mekanismen kan være aktiv transport av ioniserte SCFA i utvekling med bikarbonat (HCO_3^-) i forholdet 1:1. En annen mekanisme er aktiv transport ved hjelp av monokarboksylat-transportere (MCT1,

MCT2 og MCT4) som er hydrogen koblede og/eller natrium-avhengig monokarboksylattransporter (SMCT1). SCFA som ikke brukes av kolonocytter etter absorpsjon blir transportert gjennom basolateral membranen til systemisk sirkulasjon. Dette kan sannsynligvis skje ved at ionisert SCFA veksles med HCO_3^- (antiport) og/eller ved hjelp av monokarboksylat-transportere, MCT4 og MCT5 som er hydrogenkoblet (figur 1.4). Transportere som brukes for opptak av SCFA fra blodsirkulasjon til perifere vev er fortsatt ukjent [10, 45, 50].



Figur 1.4: Absorpsjon og transport av kortkjedede fettsyrer (SCFA) inn i tarmceller. SCFA kan bli transportert gjennom den apikale membranen i utveksling med bikarbonat (HCO_3^-) eller via symporter som monokarboksylat-transporter (MCT1) og/eller natrium-avhengig monokarboksylat-transporter (SMCT1). Små mengder SCFA kan også bli transportert via passiv diffusjon. SCFA som ikke blir oksidert av kolonocytter kan transporteres videre gjennom basolateral membran til blodsirkulasjon via fasilitert diffusjon mediert av symporter (MCT4, MCT5) og/eller ved HCO_3^- utveksling. Modifisert fra [10, 50].

Basert på tilgjengelig humane studier, blir acetat mest absorbert i lever og har høyest perifert konsentrasjon (19-160 μM) sammenlignet med propionat (1-13 μM) og butyrat (1-12 μM) [45, 52, 53]. Systemisk konsentrasjon av SCFA er avhengig av både produksjon- og absorpsjonshastighet i tarmen, noe som igjen er avhengig av kostholdet og sammensetning av tarmfloraen [45]. Det er lavere konsentrasjon av butyrat enn acetat og propionat i portalvenen, levervenen og systemisk sirkulasjon siden butyrat er en viktig energikilde for tarmceller (kolonocytter), mens konsentrasjon av acetat og propionat er mest påvirket av metabolisme i

lever. Alle de tre kortkjedede fettsyrene er tilgjengelig som forløpere for lipid- og karbohydratsyntese. Acetat og butyrat som acetyl-CoA (lipogenese) og propionat som suksinyl-CoA (glykogenese) [10].

1.5.3 Effekter av kortkjedede fettsyrer (SCFA) på energimetabolisme

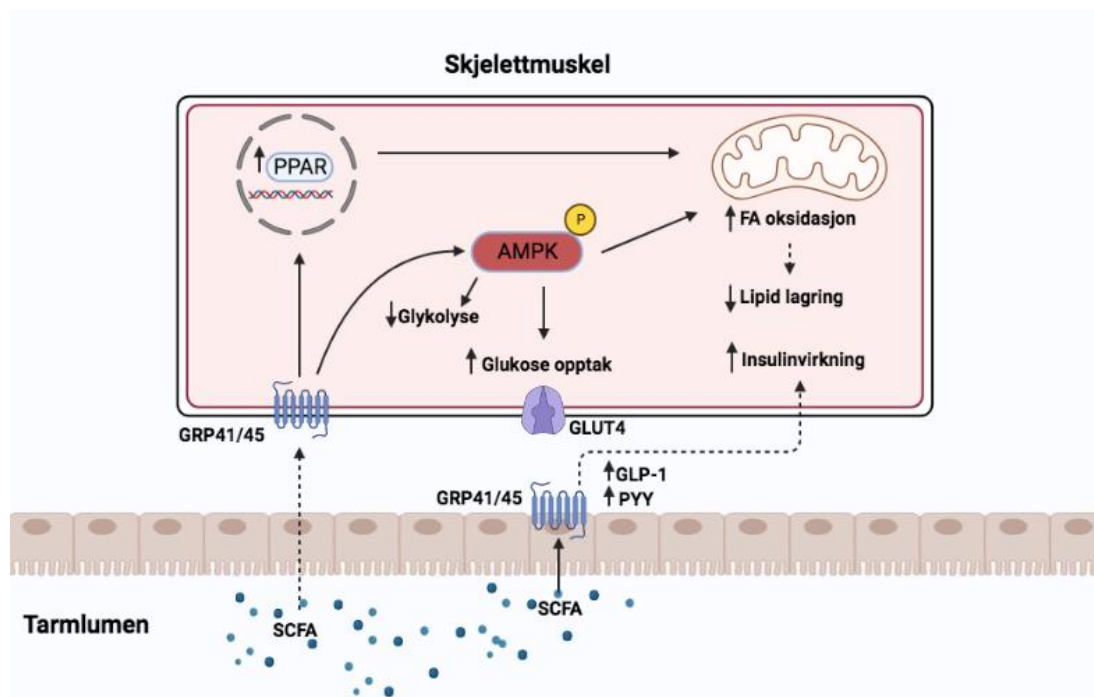
Studier har vist at SCFA kan ha direkte effekter på energimetabolisme blant annet i lever, fettvev og muskel. SCFA kan også ha indirekte effekter på energimetabolisme ved blant annet regulering av metthetsfølelse. Dette skjer ved at SCFA stimulerer sekresjon av polypeptid YY (PYY) og glukagonlignende peptid (GLP-1) fra tarmen (figur 1.5) og sekresjon av leptin fra fettvevet [45, 54, 55]. PYY er kjent som et metthetshormon, men kan også forsterke insulineffekten på glukosedisponering i muskel og fettvev. GLP-1 regulerer nivåer av glukose i blodet ved å øke sekresjon av insulin og senke sekresjon av glukagon fra pankreas [50]. SCFA kan også regulere systemisk inflammasjon, der en mulig mekanisme kan være økt sekresjon av myokiner, som interleukin-6 (IL-6), fra skjelettmuskel. Dette kan ha gunstige effekter på inflammasjon og glukose- og lipidmetabolisme [10, 56].

Det er få studier som har undersøkt direkte effekter av kortkjedede fettsyrer på glukose- og oljesyremetabolisme og insulin sensitivitet i skjelettmuskel. Studier som er gjort på rotter og mus viser at acetat og butyrat kan øke glukose- og lipidmetabolisme i skjelettmuskel, noe som igjen kan være med på å forbedre insulin sensitivitet [57-59]. Humane intervensjonsstudier indikerer at inntak av kostfibre har potensial til å endre tarmflora og dermed påvirke metabolsk regulering. Dette kan være relatert til blant annet økt andel av SCFA-produserende bakterier og høyere konsentrasjon av SCFA [60]. Zhao et al. rapporterte blant annet forbedret glukosehomeostase og reduksjon i hemoglobin A1c (HbA1c) nivåer hos pasienter med type 2-diabetes etter inntak av fiberrik kost [61].

En del av disse effektene kan være mediert via G-protein koblede reseptorer som GPR41 (Ffar3) og GPR43 (Ffar2) som er vist å være reseptor for SCFA [45, 50]. GPR43 (Ffar2) reseptor er blitt funnet i skjelettmuskelceller i kultur basert på tidligere microarray-data [62]. Disse reseptorene kobles til alfa subenheten av G-proteinet og skiller fra hverandre ved at de har ulikt affinitet for ulike typer SCFA, ulik fordeling i forskjellige vev og dermed ulike fysiologiske roller. GPR41 (også kjent som frie fettsyrer reseptor 3 =Ffar3) blir primært aktivert av propionat, så butyrat og acetat, mens GPR43 (kjent som frie fettsyrer reseptor 2 =

Ffar2) blir aktivert likt av alle tre. Disse reseptorene er uttrykt blant annet i hvitt fettvev, skjelettmuskel og lever, noe som indikerer at SCFA kan ha direkte effekter på energimetabolisme i perifere vev [45, 50].

GPR43 (Ffar2) kobles til både G_{α_i} - og G_{α_q} -subenheter av G-proteiner, mens GPR41 (Ffar3) kobles kun til G_{α_i} . Aktivering av G_{α_i} -proteiner fører først og fremst til hemming av adenylyl syklase (AC), dermed reduksjon i nivåer av cAMP, og dette vil redusere aktiviteten av cAMP-avhengige protein kinase (PKA). Binding av SCFA til G_{α_q} vil derimot aktivere fosfolipase C (PLC) som videre hydrolyserer fosfatidylinositol 4,5-bifosfat (PIP_2) til diacylglycerol (DAG) og inositol trifosfat (IP_3). DAG og IP_3 kan videre virke som sekundære budbringere, hvorav IP_3 fører til frigjøring av Ca^{2+} fra endoplasmatisk retikulum (ER) til cytosol, mens DAG aktiverer protein kinase C (PKC) [63]. Dette kan være med å fosforilere nedstrøms målmolekyler og aktivere andre signaliseringsveier som f.eks. fosforylering og aktivering av AMP-aktivert protein kinase (AMPK). Når AMPK blir aktivert kan den trigge ekspresjon av peroksisom proliferator-aktivert reseptor gamma koaktivator ($PGC1_{\alpha}$), som videre kontrollerer transkripsjonsaktivitet til flere transkripsjonsfaktorer, blant annet peroksisom proliferator-aktivert reseptorer ($PPAR_{\alpha}$, $PPAR_{\delta}$, $PPAR_{\gamma}$) (figur 1.5), lever X reseptor (LXR) og farnesoid X reseptor (FXR) [50]. Aktivering av denne signaliseringsveien kan føre til blant annet økt fettsyreoksidasjon, glukoseopptak, glykogensyntese og hemming av lipolyse og glykolyse (figur 1.5) [10, 50, 64].

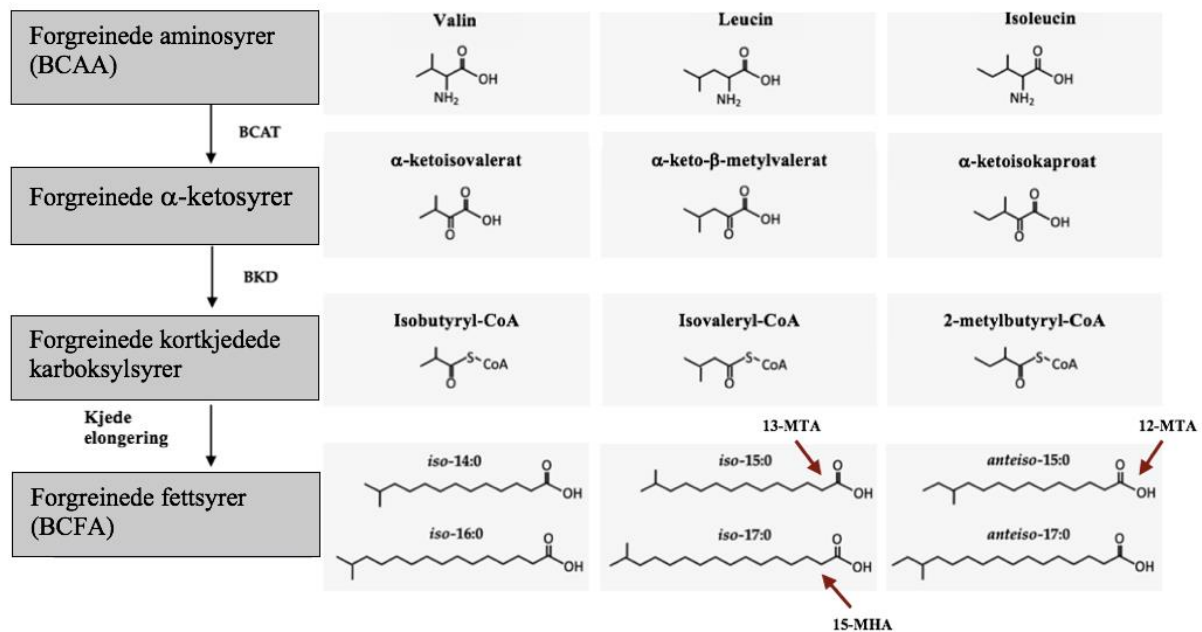


Figur 1.5: Mulige mekanismer for effekt av kortkjedede fettsyrer (SCFA) på energimetabolisme i skjelettmuskel. SCFA kan øke fettsyre (FA)-oksidasjon i skjelettmuskel muligens via økt aktivering av AMP-aktivert protein kinase (AMPK) og en peroksisom proliferator-aktivert reseptorer (PPAR)-avhengig mekanisme. I tillegg kan SCFA, særlig acetat og butyrat, øke glukoseopptak via glukosetransportør-4 (GLUT4) ved aktivering av AMPK, sannsynligvis gjennom G-proteinkoblede reseptorer (GPR41/43). SCFA kan også påvirke insulin sensitivitet og glukosemetabolisme indirekte, ved blant annet økt sekresjon av polypeptid YY (PYY) og glukagonlignende peptid (GLP-1). Heltrukne linjer indikerer at bevisene er konsekvente mellom *in vitro* og *in vivo* data. Stiplede linjer indikerer inkonsekvente bevis eller hypotetiske mekanismer. Modifisert fra [45].

1.6 Forgreinede fettsyrer (BCFA)

Forgreinede fettsyrer (BCFA=Branched Chain Fatty Acids) er en gruppe mettede og lange fettsyrer med en (mono-) eller flere (di/poly-) metylgrupper bundet til karbonkjeden. BCFA er merket med iso- eller anteiso- basert på om termineringsgruppen er isopropyl eller isobutyl. Disse fettsyre har nylig blitt foreslått som bioaktive molekyler som bidrar med positive helseeffekter forbundet med inntak av meieriprodukter. Det har blitt identifisert mer enn 50 typer BCFA i fett fra drøvtyggere, men de vanligste typene i melkefett er iso- og anteiso-mono-metyl BCFA med 14-17 karbonatomer i sin struktur [65, 66]. I denne oppgaven blir det fokusert på 12-MTA (12-metyltetradekonat), 13-MTA (13- metyltetradekonat) og 15-MHA (15-metyltetradekonat) (figur 1.6).

BCFA kan bli syntetisert i vommen til drøvtyggere ved hjelp av bakterier som nedbryter forgrenede aminosyrer (BCAA= Branched Chain Amino Acids), som valin, leucin og isoleucin fra kosten. Dette skjer ved at først blir BCAA omdannet til forgreinede α -ketosyrer ved hjelp av en BCAA transferase enzymet (BCAT) som fjerner aminogruppen. Forgreinede α -ketosyrer blir videre omdannet til forgreinede kortkjededede karboksylsyrer ved hjelp av forgrenet- α -ketosyre dehydrogenase-enzymet (BKD). Til sist blir iso- og anteiso-BCFA formet ved at forgreinede kortkjededede karboksylsyrer elongerer med malonyl-CoA ved hjelp av BCFA-syntase enzymet (figur 1.6) [65].



Figur 1.6: Biosyntese av forgreinede fettsyrer (BCFA) fra forgreinede aminosyrer (BCAA). BCAT, forgreinede aminosyrer transferase; BKD, forgrenet- α -ketosyre dehydrogenase; 12-MTA, 12-metyltetradekonat; 13-MTA, 13-metyltetradekonat; 15-MHA, 15-metyltetradekonat. Modifisert fra [65].

BCFA er blitt oppdaget i ulike vev og væsker hos mennesker, blant annet fettvev, brystmelk, colon og serum. Kosthold, særlig meieriprodukter og kjøtt er den viktigste kilden til BCFA, men man kan også få begrensede mengder av BCFA via *de novo* syntese fra BCAA som valin, leucin og isoleucin. Det er lite som er kjent om metabolisme av BCFA hos mennesker. Wallace et. al har undersøkt *de novo* syntese av BCFA i fettvev og demonstrerte at BCFA kan være endogene produkter av fettsyre-syntase (FASN), og at *in vivo*-syntese kan være påvirket av BCAA-metabolisme i mitokondrier, vevsspesifikk ekspresjon av karnitin acetyltransferase (CRAT), tarmflora og kosthold [65, 67].

Epidemiologiske studier viser at BCFA kan ha en viktig rolle i energihomeostase. Mika, et. al og Pakiet et. al. fant at fedme kan være assosiert med en reduksjon i serumnivåer av iso-BCFA [68, 69]. En *in vitro*-studie som brukte humane fettleverceller, konkluderte med at BCFA som iso-15:0 (13-MTA) og iso-18:0 reduserte cellulære nivåer av triglyserider og førte til oppregulering av en rekke gener involvert i lipid metabolisme [70]. Dette indikerer at BCFA kan være involvert i lagring av fett i kroppen, enten direkte eller indirekte [65].

1.7 Hensikt og problemstillinger

Det er få studier som har undersøkt direkte effekter av kortkjedede fettsyrer og forgreinede fettsyrer på energimetabolisme i skjelettmuskel. De fleste av disse studiene er utført *in vivo*, i muse- og rottemodeller. En del studier indikerer at kortkjedede fettsyrer kan modulere glukose og/eller fettsyremetabolisme og dermed forbedre insulinsensitivitet blant annet i skjelettmuskel [45, 57, 59]. Forgreinede fettsyrer kan ha en viktig rolle i energihomeostase [65], men man vet veldig lite om mulige effekter på energimetabolisme i skjelettmuskel. Skjelettmuskel utgjør omtrent 40 % av total kroppsmasse og er det vevet som er mest involvert i lipid- og glukoseomsetning i kroppen [1, 12]. Det er derfor av interesse å undersøke om kortkjedede og forgreinede fettsyrer har noe effekt på energimetabolisme i humane skjelettmuskelceller i kultur.

Problemstillinger som ønskes belyst i denne oppgaven er blant annet:

- Er det direkteeffekter av kortkjedede fettsyrer som eddiksyre (acetat), smørsyre (butyrat) og propansyre (propionat) på glukose- og oljesyremetabolisme i humane skjelettmuskelceller i kultur.
- Har forgreinede fettsyrer som 12-MTA (12-metyltetradekonat), 13-MTA (13-metyltetradekonat) og 15-MHA (15-metyltetradekonat) effekt på energimetabolisme i humane skjelettmuskelceller.
- Har kortkjedede og forgreinede fettsyrer noe effekt på insulin-stimulert glukoseopptak.
- Påvirkes proteinsyntese i skjelettmuskelceller eller andre muskelcellefunksjoner som myokinsekresjon av disse fettsyrene.
- Har butyrat og forgreinede fettsyrer noe effekt på lipogenese og distribusjon av ^{14}C -leucin til cellulære lipider i muskelceller.

2 Materialer og metoder

2.1 Materialer

2.1.1 Kjemikalier og reagenser

Tabell 2.1: Kjemikalier og reagenser brukt i forbindelse med oppgaven.

Kjemikalier/reagenser	Leverandør
DMEM- GlutaMAX™ lav glukose Dulbeccos fosfatbufret saltvann (DPBS) med Ca ²⁺ og Mg ²⁺ Trypsin-EDTA 0,05% β-merkaptoetanol (β-ME) Primere (RPLP0, GLUT1, CYC1, UQCRB, CPT1B, CD36)	Gibco®, Invitrogen (Life technologies™) (UK)
Natriumacetat (Sodium acetate) Natriumbutyrat (Sodium butyrate) Natriumpropionat (Sodium propionate) 4-(2-Hydroksey)piperazin-1-etansulfonsyre (HEPES) Dimetylsulfoksid (DMSO) Fosfatbufret saltvann (PBS) Føtalt kalveserum (FCS) Gentamicin 50 mg/ml Amfotericin B 250 µg/ml Ekstracellulær matriksgel (ECM) Karnitin Oljesyre Glukose Human IL-6 ELISA kit Kloroform Natriumdedocylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (Japan, India, USA, UK)
Ultroser™G	Pall Life Sciences (Cergy-Saint-Christophe, Frankrike)
Insulin Actrapid® (0,6 mM)	Novo Nordisk A/S (Bagsvæd, Danmark)

NaOH Heksan	Emsure [®] (Tyskland)
D-[¹⁴ C(U)] glukose 250 mCi/mmol D-[¹⁴ C(U)] glukose 275 mCi/mmol [1- ¹⁴ C] oljesyre 56,3 mCi/mmol ¹⁴ C-leucin 300 mCi/mmol Ultima Gold [™] F Ultima Gold [™] LSC	Perkin Elmer [™] , Inc. (USA)
Bio-Rad Protein konsentrert reagens	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
Nukleasefritt vann	Ambion [®] (USA)
12-metyltetradekansyre (12-MTA) 13-metyltetradekansyre (13-MTA) 15-metylheksadekansyre (15-MHA)	Gave fra Lars Eide, Klinikk for laboratoriemedisin, Oslo Universitetssykehus , Universitetet i Oslo (UiO)
Pierce [™] BCA proteinanalyse kit	Thermo Scientific (USA)
Aceton Trikloreddiksyre (TCA)	VWR [®] International S.A.S
Edikksyre	Chemi-Teknikk [®] (Norge)
Metanol TLC silikagel 60	Merck Millipore (Tyskland)

2.1.2 Utstyr

Tabell 2.2: Utstyr benyttet i forbindelse med oppgaven.

Utstyr	Leverandør
96-brønners Corning® CellBind Surface brett med lokk 96-brønners Corning® Costar® 6-brønners Corning® 15 ml sentrifugerør 50 ml sentrifugerør	Corning Inc. (Corning, NY, USA, Mexico)
Celleflaske 75 cm ² Nunc™ EASYFLASK™ 75 cm ² Nunclon™ Delta Surface 24-brønners Nunclon™ Delta Surface NanoDrop™ Lite Spektrometer	Thermo Fisher Scientific (Danmark)
Kryorør Sprøytefilter w/ 0,2 µm Celluloseacetatmembran	VWR® (We Enable Science) (Canada, USA)
Trappingstativ, med metallknotter, metallplate og silikonpakning	Instrumentverkstedet (Teknisk avdeling, Universitetet i Oslo, Norge)
TopSeal®-A Plus gjennomsiktig film Unifilter®-96 GF/B 96-brønners Isoplate™-brett PerkinElmer 2450 mikrobetateller (Counter Micro Beta2®) Wallac Victor ² mikroplateleser Victor Nivo Multimode mikroplateleser Packard Tri-Carb 1900 TR (væskescintillasjon)	PerkinElmer™ (Shelton, Scotland, USA)
High-Capacity cDNA revers transcription kit Power SYBR® Green PCR Master Mix PCR-maskin 2720 Thermal Cycler StepOnePlus Real-Time PCR system	Applied Biosystems (USA, UK, Kina)

MicroAmp Fast 96-well Reaction Plate	
QIAshredder kolonne RNeasy [®] plus mini kit	Qiagen GmbH (Tyskland)
Cellskråpe 24 cm	Sarstedt Inc. Newton, NC
GraphPad Prism version 9.0.1 for Windows	Graphpad software, Inc. (California, USA)

2.2 Celler og donorkarakteristika

I dette prosjektet ble det brukt humant biologisk materiale som inngikk i en forskningsbiobank ved Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo. Godkjennelse av muskelbiopsier for celleisolering og opprettelse av forskningsbiobanken er blitt gjort av regional etisk komite (REK) i forbindelse med forskningsprosjektet 11959 Alfa og Omega i livsstilsterapi (kopi av godkjenning fra REK, se appendiks 1).

Humane celler fra tre frivillige donorer (tabell 2.3) er blitt benyttet i denne studien. For alle donorene er muskelbiopsier tatt fra lårmuskulaturen (*m. vastus lateralis*).

Muskelbiopsidonorene er aidentifisert og gitt en tallkode (tabell 2.3). Donorer har gitt informert samtykke til deltakelse i prosjektet.

Tabell 2.3: Data for donorene brukt i denne studien.

Donor	Kjønn (M/K)	Alder (år)	KMI (kg/m ²)
501	M	42	<25
523	K	39	<25
566	K	54	>30

M=menn, K=kvinner, KMI=kroppsmasseindeks.

2.3 Etablering av cellebank

Satelittceller ble isolert fra muskelbiopsier ved Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo. De ble merket med donorkode og passasjennummer, og deretter fryst ned i nitrogentank ved -196 °C. For å kunne utføre flere forsøk på hver donor, ble de isolerte cellene oppskalert og deretter enten splittet eller fryst ned i nitrogentank for videre oppbevaring. Cellene ble i dette prosjektet brukt i passasje 2 og 3.

2.3.1 Oppskalering av celler

Celleampuller ble tatt ut fra nitrogentanken og tint raskt på vannbad (37 °C). Innholdet ble overført til et 50 ml sentrifugerør, og tilsatt 5 ml M1-utsåingsmedium dråpevis (se appendiks 2). Cellesuspensjon ble sentrifugert ved 1500 rpm i 7 minutter. Supernatanten ble forkastet og cellepellet ble resuspendert i 1 ml M1-utsåingsmedium, og så tilsatt 22 ml M1-utsåingsmedium. Det ble overført 7,5 ml av cellesuspensjonen til hver av tre 75 cm² flasker med Corning® CellBind® overflate og ventilert lokk. Cellene ble inkubert i inkubatorskap ved

37 °C og 5% CO₂. Etter 24 timer ble M1-utsåingsmedium skiftet med M2-proliferasjonsmedium (se appendiks 2). Cellen ble observert i lysmikroskop ved bytte av medium. M2-proliferasjonsmedium ble byttet ut hver 2. – 3. dag til cellene nådde 70-80% konfluens. Deretter ble cellene enten splittet eller fryst ned i nitrogentank ved -196 °C for evt. videre oppskalering eller forsøk på et senere tidspunkt.

2.3.2 Nedfrysning av celler

Mediet i celleflaskene (75 cm²) ble fjernet og cellene ble vasket en gang med fosfatbufret saltvann (PBS). Deretter ble 5 ml forhåndsvarmet 0,05 % trypsin/EDTA tilsatt for å løsne celler fra overflaten. Celleflaskene ble inkubert ved 37°C og 5% CO₂ i 5 minutter. Cellene ble observert i lysmikroskop for å sjekke at de hadde løsnet, så ble cellesuspensjonene overført til et 50 ml sentrifugerør, og flaskene ble vasket med 5 ml M2-proliferasjonsmedium som ble blandet med cellesuspensjonene før sentrifugering ved 1500 rpm i 7 minutter. Supernatanten ble forkastet, og cellepelleten ble resuspendert i frysemedium (se appendiks 2). Til hvert kryorør ble det tilsatt 1 ml av celler i frysemedium som umiddelbart ble fryst ned ved -20 °C. Etter 30 minutter ble celleampullene overført til -80 °C fryser i 24 timer og deretter overført til nitrogentank ved -196 °C for oppbevaring.

2.4 Celledyrking

2.4.1 Utsåing av celler

Celleampuller (kryorør) ble tatt ut fra nitrogentanken og tint raskt på vannbad (37 °C). Innholdet ble overført til et 15 ml sentrifugerør, og ble tilsatt 5 ml M1-utsåingsmedium dråpevis. Cellesuspensjonen ble sentrifugert ved 1500 rpm i 7 minutter, og supernatanten ble fjernet. Cellepellet ble resuspendert i et passende volum av M1-utsåingsmedium og blandet forsiktig. Cellesuspensjonen ble overført til 96-brønnsbrett (CellBind®) ved hjelp av multikanalpipette eller til 6- eller 24-brønnersbrett ved hjelp av finnpipette (1 ml). I 96-brønnsbrett ble det tilsatt 100 µl cellesuspensjon i hver brønn, i 6-brønnersbrett 1 ml cellesuspensjon pr brønn og i 24-brønnersbrett 300 µl cellesuspensjon pr brønn. Før utsåing av celler ble 6- og 24-brønnersbrett belagt med ekstracellulær matriks gel (ECM) (fortynnet 1:4 med DMEM Glutamax, se appendiks 2). Cellene ble deretter inkubert i inkubatorskap ved 37 °C og 5% CO₂.

2.4.2 Proliferasjon og differensiering

Etter 24 timer ble M1-utsåingsmedium byttet ut med M2-proliferasjonsmedium. M2-proliferasjonsmedium ble skiftet hver 2. - 3. dag inntil cellene nådde 70-80% konfluens. Lysmikroskop ble benyttet for å vurdere grad av konfluens. Deretter ble M2-proliferasjonsmedium skiftet til M3-differensieringsmedium (appendiks 2), som er tilsatt insulin og inneholder mindre serum. Dette for å initiere differensiering av myoblaster til flerkjernede myotuber som er modne skjelettmuskelceller. Differensieringsmedium ble skiftet hver 2. -3.dag over en 7-dagers periode.

2.4.3 Forbehandling av myotuber før forsøk

For å undersøke energimetabolisme i skjelettmuskelceller ble det brukt myotuber, altså differensierte celler. Det ble gjort forsøk på glukose- og oljesyremetabolisme i celler med og uten forbehandling. Celler uten forbehandling ble brukt som kontroll for både konsentrasjonsavhengighetsforsøk og tidsavhengighetsforsøk.

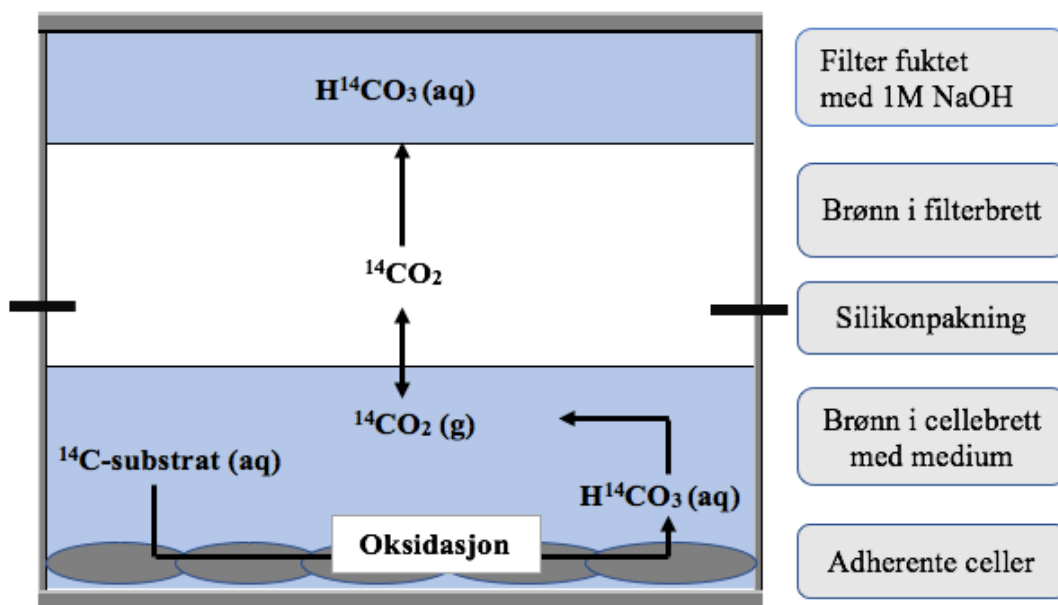
Celler ble dyrket på 96-brønners Corning® CellBIND® brett. Forbehandling med kortkjedede og forgreinede fettsyrer ble gitt til myotuber etter initiering av differensiering. Natriumsalter av eddiksyre, smørsyre og propansyre ble løst i M3-differensieringsmedium for å lage stock-løsninger (10 mM). Deretter ble stock-løsninger fortynnet til ønskede konsentrasjoner (se appendiks 2). Acetat ble fortynnet til de endelige konsentrasjonene 100, 500 og 1000 μM , mens butyrat og propionat til 10, 100 og 200 μM . Forgreinede fettsyrer som 12-metyltetradekansyre (12-MTA), 13-metyltetradekansyre (13-MTA), 15-metylheksadekansyre (15-MHA) ble fortynnet fra 100 mM til 100 μM i M3-differensieringsmedium. M3-differensieringsmedium ble brukt som kontroll for kortkjedede fettsyrer, mens for forgreinede fettsyrer ble det brukt DMSO fortynnet i M3-differensieringsmedium i en endelig konsentrasjon på 0,001%.

For konsentrasjonsavhengighetsforsøket fikk cellene forbehandling på dag 7 etter initiering av differensiering og ble inkubert med kortkjedede fettsyrer i 24 timer ved 37 °C og 5% CO₂. For å undersøke tidsavhengige effekter av kortkjedede fettsyrer fikk cellene forbehandling fra dag 4, 6 og 7 etter initiert differensiering. Det ble valgt ut noen konsentrasjoner av de ulike kortkjedede fettsyrene og gitt til cellene i henholdsvis 24, 48 og 96 timer før forsøksdagen.

For å undersøke effekter av insulin på glukosemetabolisme, fikk cellene forbehandling med kortkjedede og forgreinede fettsyrer på dag. 7 etter initiering av differensiering og ble inkubert i 24 timer ved 37 °C og 5% CO₂. Halvparten av cellene ble tilsatt 1 μM insulin under trapping.

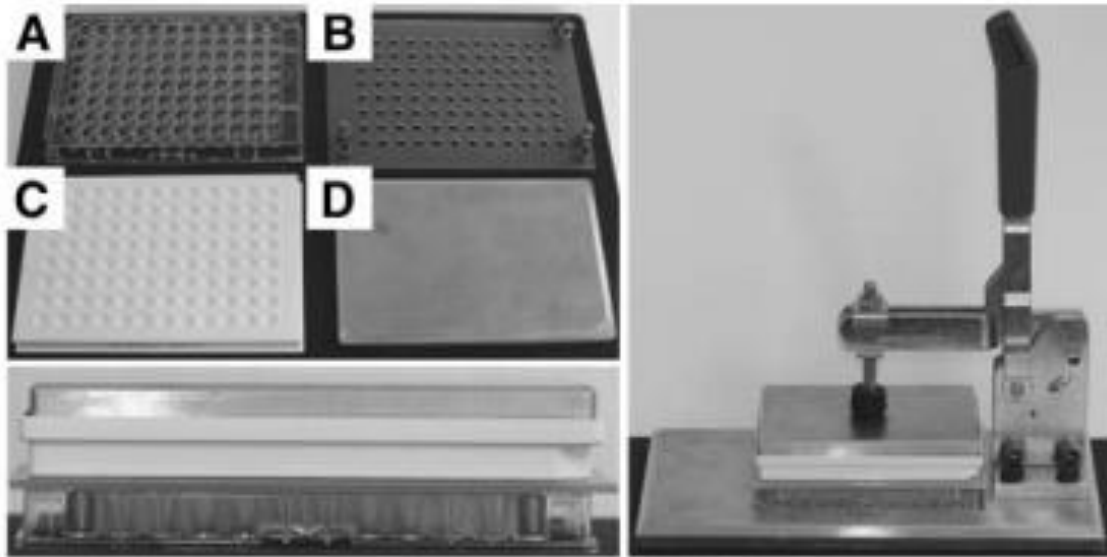
2.5 Substratoksidasjonsmetoden

Substratoksidasjonsmetoden ble brukt for å undersøke glukose- og oljesyremetabolisme i skjelettmuskelceller. Denne metoden er utviklet av Wensaas et al. i 2007 og er basert på at ¹⁴C-radiomerket glukose og/eller oljesyre tas opp og omsettes av skjelettmuskelceller dyrket i kultur [71]. Radioaktiviteten detekteres i form av ¹⁴CO₂ ved trapping, som er resultat av substratoksidasjon ved oksidativ fosforylering. Prinsippet bak metoden er illustrert i figur 2.1. Cellene inkuberes med et medium som inneholder ¹⁴C-merket substrat. Det radiomerkede substratet vil bli tatt opp av cellene og inngå i cellulær respirasjon. ¹⁴CO₂ produsert fra cellulær respirasjon vil fordampe fra cellene og reagere med 1M NaOH i filtret, og danne H¹⁴CO₃ i væskeform som fanges i filtret. Mengde ¹⁴CO₂ som fanges opp i filtret vil være et mål på fullstendig oksidasjon av ¹⁴C-merket substrat.



Figur 2.1: Prinsippet bak substratoksidasjonsmetoden: ¹⁴C-merket substrat tas opp og oksideres av adherente myotuber. Ved cellulær respirasjon dannes det ¹⁴CO₂ som reagerer med 1 M NaOH i filtret og danner H¹⁴CO₃. På denne måten vil ¹⁴CO₂ bli fanget i filtret (CO₂-trapping). Substrat som tas opp av celler, men ikke oksideres vil kunne akkumulere i cellene og måles som celleassosiert radioaktivitet (¹⁴CA). Summen av ¹⁴CO₂ og ¹⁴CA brukes som mål på totalt substratopptak i cellene. Modifisert fra [71].

Apparatet som brukes i metoden består av ulike deler som monteres til et lukket, og lufttett system (figur 2.2). Det ble brukt PerkinElmer 2450 mikrobetateller for måling av radioaktivitet fra substratene.



Figur 2.2: Utstyr for substratoksidasjonsmetoden. A: 96-brønners Corning® CellBIND® Brett. B: Silikonpakning med metallknoter for stabilisering. C: 96-brønners filter Brett (Unifilter®) fuktet med 1 M NaOH, 20 µl i hver brønn. D: Metallplate som gir jevn trykk for å oppnå lufttetthet i systemet. Til høyre: de ulike delene er montert til en sandwich og plassert i et trappingsstativ som presser delene sammen [71].

2.5.1 $^{14}\text{CO}_2$ trapping

CO_2 -trapping ble gjort på differensieringsdag 6-8 og gjennomført i 4 timer ved 37 °C. Først ble cellene observert i lysmikroskop og trappingsstativ satt inn i inkubator for oppvarming. Differensieringsmediet med evt. forbehandling ble fjernet, og cellene ble vasket med DPBS før tilsetting av radiomerket medium (se appendiks 4). 96-brønnsbrett med celler og radiomerket medium ble plassert nederst i trappingsstativet med silikonpakning over stabilisert av metallknotter. Et 96-brønnes Unifilter® ble plassert over silikonpakningen med filtersiden ned. Baksiden av filtret ble forseglet for å unngå at CO_2 slipper ut. Før trapping ble filteret fuktet med 20 µl 1 M NaOH pr. brønn for å aktivere filteret til å fange CO_2 . Sandwichen ble låst sammen vha. metallplate og låsespaken på stativet. Det hele ble satt inn i inkubator i 4 timer ved 37 °C og 5% CO_2 for substratopptak og -oksidasjon.

Etter trapping ble «sandwichen» demontert, og det radiomerkede mediet ble fjernet fra 96-brønnersbrettet. Cellene ble vasket 2 ganger med 150 μ l PBS, og tilsatt 200 μ l 0,1 M NaOH pr. brønn for å lysere cellene. 96-brønnsbrett med lyserte celler ble fryst ned ved -20°C . Unifilter[®] ble tilsatt 40 μ l tellevæske pr. brønn (Ultima Gold[™] F) og forseglet med TopSeal[™]- A Plus gjennomsiktig film på toppen. Filterbrettene ble hensatt ved romtemperatur i minimum 48 timer før $^{14}\text{CO}_2$ ble detektert med PerkinElmer 2450 mikroplateteller (Counter Micro Beta2[®]).

2.5.2 Celleassosiert radioaktivitet

96-brønnersbrett med nedfryst cellelysat ble tint opp i romtemperatur, og cellene ble homogenisert ved pipettering opp og ned noen ganger. Det ble overført 50 μ l cellelysat til hver brønn i et 96-brønners Isoplate[™]-brett (scintillasjonsplate), og 50 μ l av den radioaktivt merkede substratløsningen som var til overs fra trapping ble tilsatt i tripletter i ledige brønner på siden. Deretter ble det tilsatt 100 μ l scintillasjonsvæske (Ultima Gold[™] F) til hver brønn. Brettet ble dekket med TopSeal[™]- A Plus gjennomsiktig film og hensatt i romtemperatur i minst 2 timer. Celleassosiert radioaktivitet (^{14}CA) ble målt ved hjelp av PerkinElmer 2450 mikroplateteller (Micro Beta2[®]).

Celleassosiert radioaktivitet (^{14}CA) er mengde radioaktivitet som akkumuleres i cellene, altså det som forblir i det nederste laget av adherente celler (figur 2.1). ^{14}CA sammen med $^{14}\text{CO}_2$ gir et estimat på totalt opptak av radiomerket substrat i cellene. Dette kan videre brukes til å beregne fraksjonell oksidasjon som er andel oksidert radiomerket substrat i forhold til totalt opptak.

2.6 Bradford metode for å måle proteinkonsentrasjon

En metode utviklet av Bradford ble benyttet for å kvantifisere total mengde proteiner i cellelysater [72]. Proteinkonsentrasjon ble brukt som mål på mengde celler i hver brønn. Prinsippet bak denne metoden er at fargestoffet Coomassie Brilliant Blue bytter farge med absorpsjonsmaksimum fra 465 nm til 595 nm (blå) når det bindes til proteiner under sure betingelser. Absorbans ved 595 nm måles fotospektrometrisk og gir et kvantitativt uttrykk.

Først ble det laget proteinstandarder bestående av bovint serumalbumin (BSA) løst i 0,1 M NaOH i ulike konsentrasjoner. Konsentrasjonene som ble benyttet til å lage standardkurven var 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2 og 0,3 mg/ml. Fra denne standardkurven kan den totale mengde proteiner i en ukjent prøve estimeres siden absorbansen er direkte proporsjonal med mengden proteiner tilstede.

Bio-Rad Protein konsentrert reagens som inneholder Coomassie Brilliant Blue ble fortynnet 1:4 med deionisert vann, filtrert gjennom et 0,20 µm-filter for å fjerne partikler. Standarder ble tilsatt i de to første kolonnene i et Corning® Costar®-brett, to paralleller av hver standard med 50 µl pr. brønn. Deretter ble det overført 50 µl av cellelysate til ledige brønner i Corning® Costar®-brettet. Så ble 200 µl av fortynnet BioRad Protein Assay reagens tilsatt hver brønn, både prøver og standarder. Brettet ble plassert i Wallac Victor² mikroplateleser etter fjerning av eventuelle luftbobler. Absorbansen ble målt ved bølgelengde 595 nm, og proteinkonsentrasjoner i prøvene ble beregnet basert på de kjente konsentrasjonene i standardkurven.

2.7 Real-time RT-PCR

Polymerase-kjedereaksjon (PCR) er en metode for enzymatisk syntese av DNA. Den kan benyttes for å amplifisere et enkelt DNA-fragment i en syklisk prosess til flere millioner kopier. Dette gjør det mulig å kvantifisere det aktuelle DNA-fragmentet. Metoden kan brukes for å studere endringer i genekspressjon i celler som vokser i kultur [73].

I denne oppgaven ble kvantitativ polymerase-kjedereaksjon (qPCR), også kjent som revers-transkriptase real-time PCR (RT-qPCR) benyttet. Metoden ble brukt som en relativ kvantifiseringsanalyse for å studere endringer i genekspressjon etter forbehandling med kortkjedede og forgreinede fettsyrer. En relativ kvantifisering gir informasjon om hvorvidt uttrykket av mRNA øker eller minker når cellene utsettes for eksperimentelle forhold. Relativ kvantifisering gjøres ved å bruke delta-delta-Ct metoden. I en slik analyse brukes terskelverdien (C_t = cycle-treshold) som mål på ekspresjon. Først må målgenet normaliseres mot en/flere referansegener, deretter finner man relativ forskjell i genekspressjon av målgenet mellom celler som er behandlet og celler som er ubehandlet (kontroll) (se appendiks 6 for formler) [74].

Celler ble dyrket til flerkjernede myotuber etter samme prosedyre som i avsnitt 2.4.1, men i istedenfor 96-brønnsbrett ble det brukt 6-brønnsbrett Corning®. Det ble sådd ut celler på tre 6-brønnsbrett for hver donor, til sammen ni brett. Cellene ble forbehandlet med kortkjedede og forgreinede fettsyrer i 24 timer før høsting. Hver behandling ble tilsatt i to brønner og senere ved høsting ble lysatet fra to brønner slått sammen til en prøve.

2.7.1 Høsting av celler til RT-PCR

QIAshredder og buffer fra RNeasy® Plus Mini Kit fra Qiagen ble benyttet under høsting av celler. Cellene fikk forbehandling på differensieringsdag 7 og ble høstet etter 24 timers behandling. Differensieringsmediene ble tatt av, overført til egne eppendorfrør merket med dato og donorkode, og fryst ned ved -20°C for senere måling av interleukin-6 (IL-6) med ELISA (se avsnitt 2.8). Cellene ble vasket 2 ganger med 2 ml PBS og tilsatt 250 μl lysesbuffer per brønn (Buffer RLT Plus tilsatt β -merkaptoetanol (β -ME) 10 μl /ml). Cellene ble skrapet løs, og lysatet fra to brønner ble slått sammen til en prøve som ble fryst ned ved -80°C til senere RNA-isolering.

2.7.2 RNA-isolering

Total RNA ble isolert fra myotuber ved å bruke RNeasy[®] Plus Mini Kit fra Qiagen. Samlerøret som var fryst ned etter høsting ble tint opp ved 37⁰C. Lysatet ble overført til en kolonne som binder genomisk DNA (gDNA) og sentrifugert i 30 sekunder ved 8000 g. Kolonnen (filter med gDNA) ble forkastet, filtratet ble tilsatt et tilsvarende volum 70 % etanol (500 µl) og blandet ved pipettering. Deretter ble blandingen overført til en RNA-bindende sentrifugekolonne (RNeasy spin column), plassert i et oppsamlingsrør (2 ml) og sentrifugert i 15 sekunder ved 8000 g. Dette ble gjort i to omganger siden kolonnen har kapasitet til kun 700 µl. Filtratet ble forkastet i hver omgang.

Etter dette ble det tilsatt 700 µl RW1 buffer til samme kolonne og sentrifugert på nytt i 15 sekunder ved 8000 g. Filtratet ble kastet og 500 µl RPE buffer med etanol ble tilsatt til samme kolonne. Kolonnen ble sentrifugert i 15 sekunder ved 8000 g. Det ble tilsatt ytterligere 500 µl RPE til samme kolonne og sentrifugert i 2 minutter ved 8000 g. Filtratet ble kastet i begge omganger. Dette for å fjerne salter fra forrige vasketrinn. Kolonnen ble plassert i et nytt samlerør og sentrifugert i 1 minutt for å tørke membranen før eluering. For å eluere RNA ble 30 µl RNase-fritt vann tilsatt direkte på membranen etter at den var plassert i et nytt samlingsrør (1,5 ml), og røret ble sentrifugert i 1 minutt ved 8000 g.

2.7.3 Måling av RNA-konsentrasjon

Det ble brukt NanoDrop[™] Lite Spektrometer fra Thermo Fisher Scientific for å måle RNA-konsentrasjon og vurdere renheten av isolert RNA fra hver prøve. Først ble det laget en blank prøve med nukleasefritt vann, så ble 1,5 µl av hver prøve plassert på måleplaten.

Konsentrasjonen av RNA ble oppgitt i ng/µl, og renheten til RNA-løsning blir oppgitt som ratioen av absorbans ved 260 og 280 nm, der en ratio på ca. 2 er karakteristisk for rent RNA.

2.7.4 cDNA-syntese

RNA som var isolert ble omdannet til komplementært DNA (cDNA) siden det skulle brukes DNA-polymerase i qPCR-kjøringen. For syntese av cDNA ble det brukt High-Capacity cDNA revers transcription kit fra Applied Biosystems. Det ble laget en reaksjonsblanding av standardiserte mengder med reverstranskriptase, tilfeldig primere, dNTPs (nukleotidtrifosfater festet til deoksyribose) og RNase-hemmere. Det ble tatt ut 0,3 µg RNA fra hver prøve til et mini-ependorfrør (MicroAmp[®]), og nukleasefritt vann ble tilsatt til et totalvolum på 13,2 µl (se appendiks 5). Deretter ble 6,8 µl av reaksjonsblandingen tilsatt hver prøve. Prøvene ble forsegleet og plassert i PCR-maskinen 2720 Thermal Cycler fra Applied Biosystems for cDNA-syntetisering. cDNA-syntese ble kjørt i en syklus med følgende temperaturbetingelser: 25⁰C i 10 min for at primere skal binde templat, 37⁰C i 120 min for reverstranskribering og 85⁰C i 5 min for inaktivering av reverstranskriptase.

2.7.5 qPCR-kjøring

qPCR ble utført ved bruk av StepOnePlus[®] Real-Time PCR system (Applied Biosystems). For deteksjon av PCR-produkter ble det benyttet Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). SYBR Green er et fargestoff som fluoriseres når det bindes til dobbeltrådige PCR-produkter som dannes i ekstensjonsfasen. Intensiteten på fluorescensen er avhengig av mengde cDNA i prøvene. Når amplifisering starter vil fluorescenssignalet øke, noe som reflekterer eksponentiell økning av PCR-produkt. Dette skjer vanligvis etter 25-30 sykluser og bestemmes som terskelverdien (Ct), som er antall sykluser hver prøve bruker for å nå en viss verdi (amplifikasjons-terskel). Ct-verdien vil være ulik og avhengig av hvor mye cDNA det var i prøven i utgangspunktet. Jo flere sykluser det tar for å nå Ct-verdien, jo mindre mRNA var i prøven i utgangspunktet [73, 74].

Målgene som ble studert i denne oppgaven vises i tabell 2.4. Målgene ble relatert til referansegeneet syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0 (RPLP0), som er et såkalt «housekeeping gene», og ble valgt ut på bakgrunn av at det uttrykkes stabilt i alle celler og er tidligere benyttet i studier av skjelettmuskelceller [75].

Tabell 2.4: Oversikt over primere benyttet i oppgaven.

Gener	Genbanknummer	Primer
RPLP0 (36B4)	M17885	F: 5'-CCA TTC TAT CAT CAA CGG GTA CAA-3' R: 5'-AGC AAG TGG GAA GGT GTA ATC C-3'
CYC1	NM001916	F: 5'-CTG CCA ACA ACG GAG CAT T-3' R: 5'-CGT GAG CAG GGA GAA GAC GTA-3'
UQCRB	NM_006294.4	F: 5'-AAG GTC CAA GGT CTC CTC TCT TC-3' R: 5'-CAT CTC CAG CAG GTA CTT CAC TCA-3'
CPT1B	D1852C12	F: 5'-GAG GCC TCA ATG ACC AGA ATG -3' R: 5'-GTG GAC TCG CTG GTA CAG GAA-3'
GLUT 1	K03195	F: 5'-CAG CAG CCC TAA GGA TCT CTC A-3' R: 5'-CCG GCT CGG CTG ACA TC-3'
CD36	L06850	F: 5'-AGT CAC TGC GAC ATG ATT AAT GGT-3' R: 5'-CTG CAA TAC CTG GCT TTT CTC AA-3'

RPLP0, syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0; CYC1, cytokrom c1; UQCRB, ubiquinol-cytokrom c-reduktase-bindende protein; CPT1B, Karnitin-palmitoyltransferase 1B; GLUT1, glukosetransportør 1; CD36, blodplate-glykoprotein 4; F, forward; R, reverse.

Det ble laget en primerspesifikk reaksjonsblanding for hvert gen som skulle studeres (se appendiks 6). For å lage cDNA-miks ble det tatt ut 2,5 µl av hver prøve. Blandingen ble fortynnet 1:5 i nukelasefritt vann. Deretter ble 2,5 µl av fortynnet cDNA-prøve og 22,5 µl SYBR Green PCR-miks med riktige primere for målgenet tilsatt hver brønn i et 96-brønners plate (MicroAmp® Fast 96-well Reaction Plate, Applied Biosystems). Primere ble benyttet i endelig konsentrasjon på 30 µM. For hvert primerpar ble det applisert duplikater av negativ kontroll, bestående av mastermiks og nukelasefritt vann (uten primere). Platen ble deretter dekket med en plastfilm, rask sentrifugert og satt inn i StepOnePlus® Real-Time PCR system (Applied Biosystems).

En syklus i qPCR-reaksjonen består av flere trinn. Det første trinnet innebærer gradvis oppvarming til 95 °C, noe som fører til denaturering av dobbeltrådig cDNA ved at hydrogenbindingene mellom baseparene brytes. Deretter senkes temperaturen til ca. 60 °C for at primere skal hybridisere spesifikt til sin komplementære sekvens i målgenet. I siste trinnet økes temperaturen igjen til ca. 72 °C slik at DNA-polymerase kan elongere DNA og polymerisering kan foregå. PCR-produktet genereres fra og med syklus tre og fordobles for

hver syklus (eksponentiell vekst). qPCR ble kjørt i 41 sykluser, der kjøringen begynte med 1 syklus på 95 °C i 10 min, etterfulgt av 40 sykluser med 95 °C i 15 sekunder og 60 °C i 1 min.

2.8 Kvantifisering av interleukin-6

Det var ønskelig å undersøke om forbehandling av myotuber med kortkjedede- og forgreinende fettsyrer påvirket sekresjonen av myokiner som interleukin-6 (IL-6). Kvantifisering av interleukin-6 ble utført ved hjelp av humant IL-6 ELISA (Enzym-Linked Immunosorbent Assay) kitet fra Sigma-Aldrich og i henhold til protokollen.

I denne oppgaven ble det brukt sandwich ELISA, en metode for kvantitative målinger av målprotein i biologiske prøver, som i dette tilfellet var cellemedier fra humane myotuber. Prøver ble tatt av M3-differensieringsmediet fra 6-brønnersbrett med celler som ble høstet til qPCR. Prøvene ble fortynnet 3x og standarder ble laget i henhold til protokollen i kitet. Deretter ble 100 µl av hver standard og prøve tilsatt i duplikater i et 96-brønnersbrett, og som negativ kontroll ble det brukt et tilsvarende volum av M3-differensieringsmedium som ikke hadde vært i kontakt med celler.

Det 96-brønnersbrettet som var brukt hadde et primært antistoff bundet til bunnen, slik at når prøvene ble tilsatt, ville antigenet (IL-6) i prøven kunne binde seg til antistoffet. Deretter ble det tilsatt et deteksjonsantistoff merket med biotin (sekundært antistoff enzym-konjugert til biotin). Så ble HRP (horseradish peroxidase)-streptavidin tilsatt, hvor streptavidin bindes til biotin. Mellom hver trinn ble brettet vasket grundig med en vaskebuffer for å fjerne ubundne protein. Til sist blir TMB (tetrametylbenzidin) substrat tilsatt, slik at HRP-enzymet (horseradish peroxidase) ville starte den enzymatiske reaksjonen og produsere en blåfarge. Denne reaksjonen ble stoppet med syre, slik at fargen skiftet til gul. Wallac Victor² mikroplateleser ble brukt for å detektere absorbans ved 450 nm.

2.9 Proteinmåling med Pierce

Pierce™ BCA proteinanalyse kit (Thermo Scientific) ble benyttet til måling av mengde proteiner før utførelse av proteinsyntese- og tynnsjikt-kromatografi-forsøkene. Først ble det laget proteinstandarder bestående av bovint serumalbumin (BSA) løst i 0,1% SDS i ulike konsentrasjoner. Konsentrasjonene som ble benyttet til å lage standardkurven var 0, 0,03, 0,06, 0,125, 0,5 og 1 mg/ml. Deretter ble det laget Pierce-løsning ved å blande reagens A med reagens B i forholdet 50:1.

Standarder ble tilsatt i de to første kolonnene i et Corning® Costar®-brett, to paralleller av hver standard med 10 µl pr. brønn. Deretter ble det overført 10 µl av cellelysat til ledige brønner i Corning® Costar®-brettet. Så ble 200 µl av fortynnet Pierce-løsning tilsatt hver brønn, både prøver og standarder. Brettet ble dekket med gjennomsiktig film og satt til inkubering ved 37 °C i 30 minutter. Victor Nivo™ Multimode mikroplateleser ble brukt for å detektere absorbans ved 560 nm.

2.10 Proteinsyntese

For å undersøke om kortkjedede og forgrenede fettsyrer har noe effekt på muskelmasse, ble proteinsyntese i humane skjelettmuskelceller studert. Cellene ble dyrket i 24-brønnersbrett og forbehandlet med kortkjedede fettsyrer (acetat 100 µM, butyrat 100 µM eller propionat 200 µM), og forgreinede fettsyrer (12-MTA, 13-MTA eller 15-MHA 100 µM) på dag 6 etter initiert differensiering. Cellene ble samtidig tilsatt ¹⁴C-leucin (1 µCi/ml, 0,8 mM) i 24 timer (100 µl /brønn). Etter 24 timers inkubering ble cellene vasket med PBS og lysert i 0,01% SDS (130 µl /brønn). Mengde proteiner per brønn ble bestemt ved hjelp av Pierce™ BCA proteinanalyse kit (Thermo Scientific) (se avsnitt 2.9).

Det ble tatt ut 100 µl av cellelysat fra hver brønn og overført til et 2 ml eppendorfrør. Proteiner fra cellelysat ble utfelt med 60 µl 6% BSA og 100 µl 50% trikloreddiksyre (TCA) overnatt ved -20°C. Dagen etter ble prøvene sentrifugert i 10 min. ved 12000 g i 4°C for å danne protein pellet. Supernatanten ble forkastet og pelleten ble så vasket i 1 ml acetone, sentrifugert ved 6000 g i 4°C, lufttørket og resuspendert i 500 µl SDS-NaOH (2% SDS i 0,15 M NaOH). Deretter ble hele volumet (500 µl) overført til tellerør og tilsatt 3 ml scintillasjonsvæske (Ultima Gold™ LSC). Radioaktivitet ble målt ved hjelp av

væskescintillasjon (Packard Tri-Carb 1900 TR, PerkinElmer), og mengde merket protein ble normalisert mot total innhold av proteiner i cellene.

2.11 Lipiddistribusjon

For å undersøke lipiddistribusjon etter forbehandling med butyrat og forgreinede fettsyrer, ble cellene dyrket i 6-brønnersbrett og inkubert med forgreinede fettsyrer som 12-MTA, 13-MTM eller 15-MHA 100 μ M og butyrat 100 μ M i 24 timer. Myotubene ble samtidig inkubert med 14 C-leucin (1 μ Ci/ml, 0,8 mM). Dagen etter ble cellene vasket to ganger med kald PBS, tilsatt 500 μ l 0,1% SDS per brønn og fryst ned ved -20°C . Det ble tatt ut 10 μ l av homogen celleduspensjon for proteinbestemmelse ved hjelp av PierceTM BCA proteinanalyse kit (Thermo Scientific) (se avsnitt 2.9). Resten av celleduspensjonen ble tilsatt 8 ml kloroform:metanol (2:1), og 50 μ l føtalt kalveserum (FCS) for ekstraksjon av lipider. Rørene ble ristet forsiktig og satt til vent i minimum 30 min. før 2 ml 0,9 % NaCl-buffer (se appendiks 3) ble tilsatt. Rørene ble ristet og sentrifuger i 10 min ved 1000 rpm. Deretter ble den øvre metanol-vann-fasen og protein sjiktet forsiktig sugd av. Kloroformfasen ble dampet inn under nitrogengass ved 40°C . Til slutt ble rørene tilsatt 130 μ l heksan og ristet på vortex-mikser.

Separasjon av lipider ble gjort ved hjelp av tynnsjikt-kromatografi (TLC). Løsninger fra celler og standarder ble applisert på tynnsjiktplaten. Standardene som ble brukt var frie fettsyrer (FFA), mono-, di- og triglyserider og kolesterolester. Lipidekstrakter ble separert i et lukket kammer i et upolart løpemiddel (heksan:eter:isedikk, 65:35:1) i ca. 1 time.

Tynnsjiktplaten ble så satt inn i et jod-kammer for å fremkalle lipidene på kromatogrammet. Jodflekkene ble identifisert, markert, båndene klipt ut og overført til små hetteglass ved hjelp av en trakt. Prøvene ble tilsatt 3 ml tellevæske (Ultima GoldTM LSC), og radioaktivitet målt ved hjelp av væskescintillasjon (Packard Tri-Carb 1900 TR, PerkinElmer). Mengde lipider ble relatert til total innhold av proteiner i cellene som var bestemt vha. PierceTM BCA proteinanalysemetoden.

2.12 Statistikk

Statistiske analyser ble utført ved hjelp av GraphPad Prism 9 for Windows og Microsoft Excel. Det ble antatt normalfordeling av dataene, og parametriske statistiske tester som paret t-test (også kalt Students t-test) ble benyttet. Det ble brukt signifikansnivå på 5% ($\alpha=0,05$), og p-verdier $<0,05$ ble ansatt som statistisk signifikante, vist som * eller #. Dataene er presentert som gjennomsnittsverdi \pm standard feil .

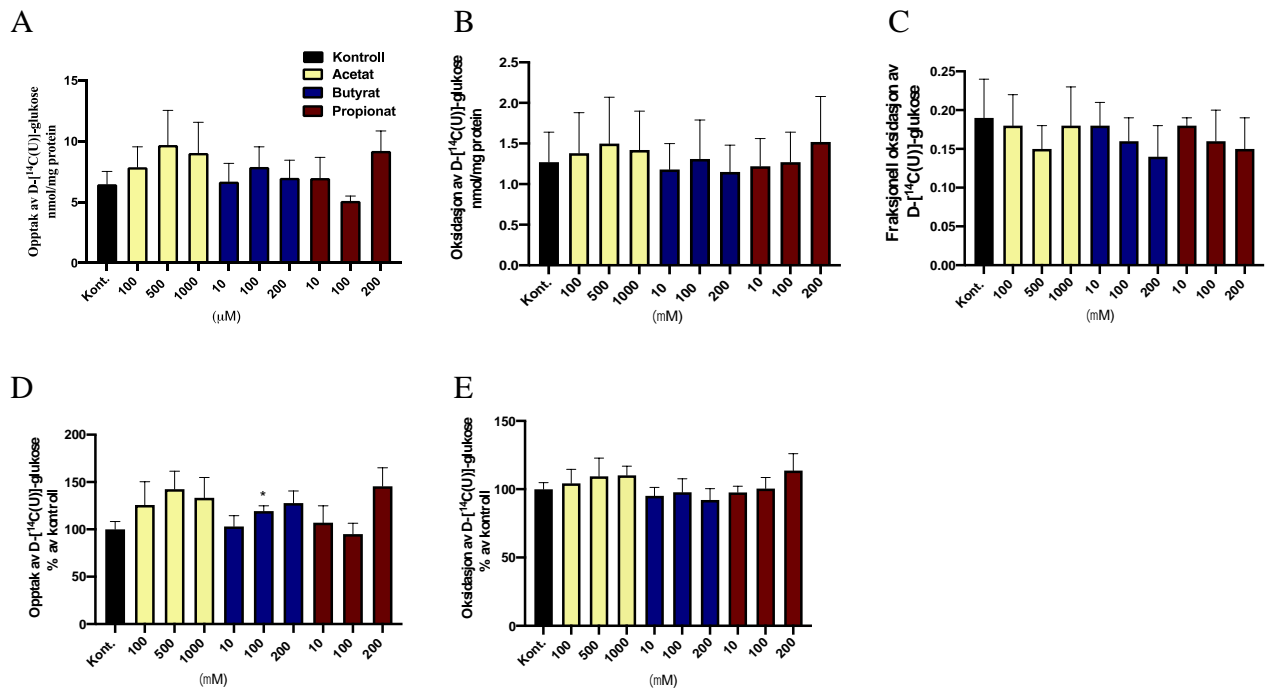
I konsentrasjonsavhengighets- og tidsavhengighetsforsøk ble det brukt gjennomsnitt beregnet fra 8 paralleller per prøve. For substratoksidasjonsmetoden ble det beregnet gjennomsnitt fra 4 paralleller. I qPCR- og tynnsjikt-kromatografi-forsøkene ble gjennomsnitt tatt av duplikater. I proteinsynteseforsøket ble det beregnet gjennomsnitt fra triplerter. N angir antall separate forsøk med henholdsvis 2, 3, 4, eller 8 paralleller.

3 Resultater

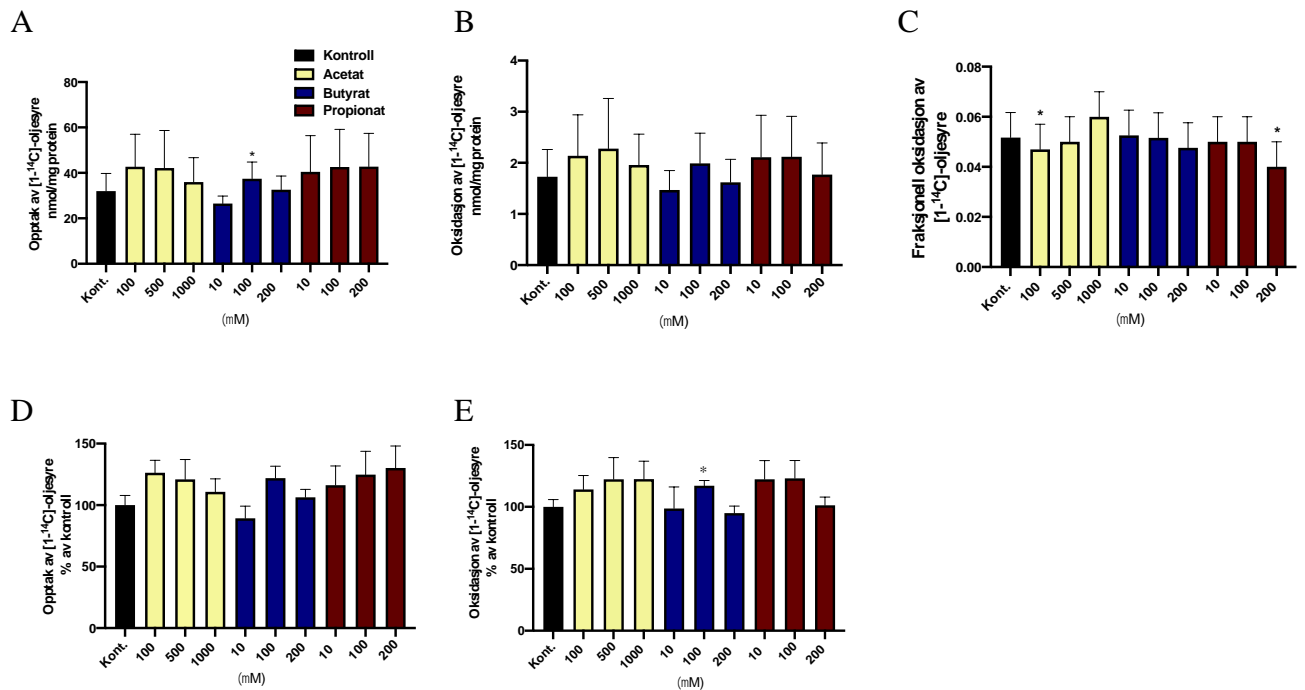
3.1 Konsentrasjonsavhengige effekter av kortkjedede fettsyrer på energimetabolisme

Det var ønskelig å undersøke om kortkjedede fettsyrer har direkte effekter på glukose- og oljesyremetabolisme i skjelettmuskelceller. For å studere dette ble myotubene forbehandlet med kortkjedede fettsyrer i 24 timer. Det ble brukt ulike konsentrasjoner av de valgte kortkjedede fettsyrene, acetat i konsentrasjoner på 100, 500 og 1000 μM , butyrat og propionat i konsentrasjoner på 10, 100 og 200 μM . M3-differensieringsmedium ble brukt som kontroll (se appendiks 2).

Effekt av kortkjedede fettsyrer på glukose- og oljesyremetabolisme er vist i figur 3.1 og 3.2. Resultatene viste at butyrat 100 μM økte glukoseopptak med 20 ($\pm 5,5$) % sammenlignet med kontroll (figur 3.1 D). Når det gjelder glukoseoksidasjon ble det ikke funnet signifikante effekter av noen av de kortkjedede fettsyrene (figur 3.1 B, E). Butyrat 100 μM førte til signifikant økning i oljesyreopptaket ($37,5 \pm 7,3$ nmol/mg) sammenlignet med kontroll ($32,0 \pm 8,0$ nmol/mg) (figur 3.2 A). Normalisert til kontrollen var også oljesyreoksidasjon økt med 17 ($\pm 4,2$) % etter forbehandling med butyrat 100 μM (figur 3.2 E). Propionat 200 μM og acetat 100 μM førte imidlertid til en signifikant reduksjon i fraksjonell oksidasjon av oljesyre på henholdsvis 17 ($\pm 0,01$) % og 10 ($\pm 0,01$) % (figur 3.2 C).



Figur 3.1: Effekter av ulike konsentrasjoner av kortkjedede fettsyrer på glukosemetabolisme i skjelettmuskelceller. Myotuber ble forbehandlet med 100, 500 og 1000 μM acetat, 10, 100 og 200 μM butyrat eller propionat i 24 timer før myotubene ble inkubert i fire timer med 200 μM D-[14C(U)] glukose (1 μCi/ml). CO₂ produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) ble så målt ved substratoksidasjonsmetoden. **A:** Opptak av glukose (CO₂+CA). **B:** Oksidasjon av glukose til CO₂. **C:** Fraksjonell oksidasjon av glukose (CO₂ / (CO₂+CA)). **D:** Opptak av glukose i % av kontroll. **E:** Oksidasjon av glukose i % av kontroll. Alle resultatene er presentert som gjennomsnitt ± standard feil, n=4, *p<0,05 sammenlignet med kontroll.



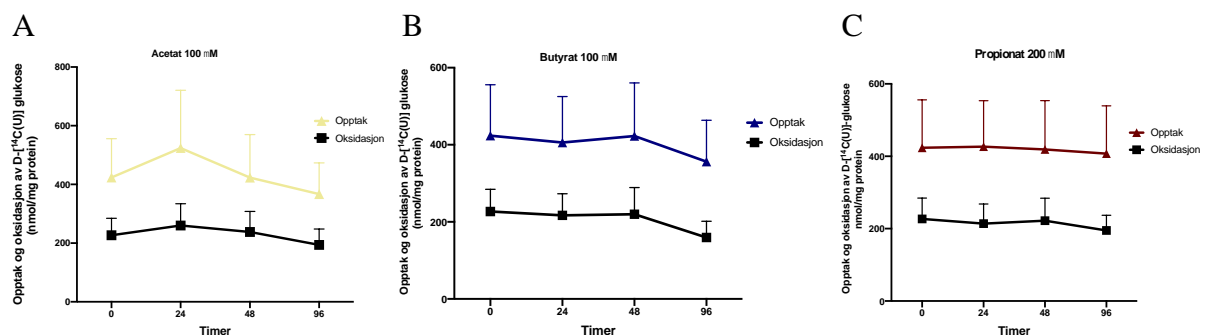
Figur 3.2: Effekter av ulike konsentrasjoner av kortkjedede fettsyrer på oljesyremetabolisme.

Myotuber ble forbehandlet med 100, 500 og 1000 μM acetat, 10, 100 og 200 μM butyrat eller propionat i 24 timer før myotubene ble inkubert i fire timer med 100 μM [1-¹⁴C] oljesyre (1 $\mu\text{Ci/ml}$). CO₂ produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) ble så målt ved substratoksidasjonsmetoden. **A:** Opptak av oljesyre (CO₂+CA). **B:** Oksidasjon av oljesyre til CO₂. **C:** Fraksjonell oksidasjon av oljesyre (CO₂ / (CO₂+CA)). **D:** Opptak av oljesyre i % av kontroll. **E:** Oksidasjon av oljesyre i % av kontroll. Alle resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm standard feil, n=4, *p<0,05 sammenlignet med kontroll.

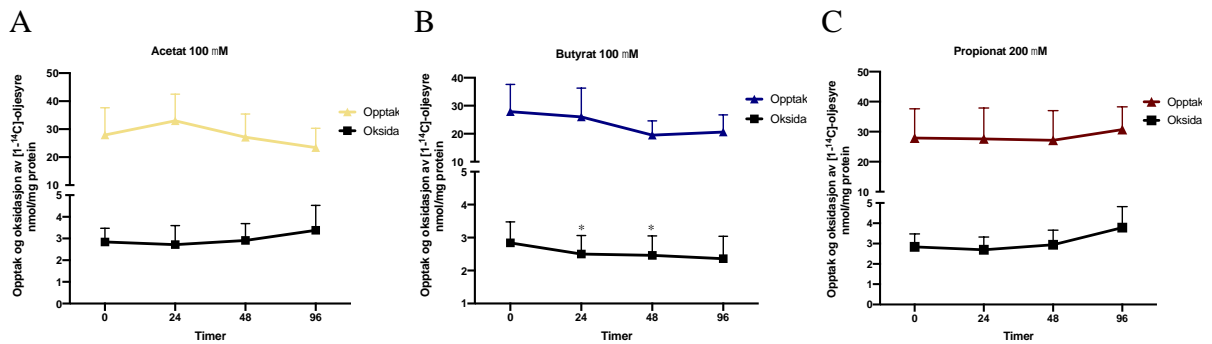
3.2 Tidsavhengige effekter av kortkjedede fettsyrer på energimetabolisme

For å undersøke om effekten av de kortkjedede fettsyrene acetat, butyrat og propionat på glukose- og oljesyremetabolisme i skjelettmuskelceller var tidsavhengige, ble det valgt ut en konsentrasjon av hver av de kortkjedede fettsyrene på bakgrunn av signifikante effekter i figur 3.1 og 3.2. Myotubene ble forbehandlet med acetat 100 μ M, butyrat 100 μ M eller propionat 200 μ M i 24, 48 og 96 timer i forkant av forsøksdagen (CO_2 -trapping). M3-differensieringsmedium ble brukt som kontroll (se appendiks 2).

Det ble ikke funnet noen signifikante effekter av kortkjedede fettsyrer på glukoseopptak eller -oksidasjon ved noen av de valgte tidspunktene (figur 3.3 A-C). For oljesyreoksidasjon var det butyrat 100 μ M som ga signifikant reduksjon med 10 ($\pm 0,6$) % etter 24 timer og 14 ($\pm 4,4$) % etter 48 timer (figur 3.4 B). Det ble ikke funnet noen signifikante effekter på oljesyreopptak (figur 3.4 A-C). Resultatene i figur 3.1 og 3.2 lot seg ikke reproducere i disse forsøkene, imidlertid må det sies at i disse forsøkene ble det registrert veldig lave telletall, slik at forsøkene er beheftet med en stor usikkerhet.



Figur 3.3: Tidsavhengige effekter av kortkjedede fettsyrer på glukosemetabolisme. På differensieringsdag 4, 6 og 7 ble myotubene forbehandlet med acetat 100 μ M, butyrat 100 μ M eller propionat 200 μ M i henholdsvis 96, 48 og 24 timer før forsøksdagen (CO_2 -trapping). Etter forbehandling ble myotubene inkubert i fire timer med 200 μ M D-[^{14}C (U)] glukose (1 $\mu\text{Ci/ml}$). Deretter ble CO_2 produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) målt ved substratoksidasjonsmetoden. **A:** Opptak (CO_2 +CA) og oksidasjon av glukose ved forbehandling med acetat. **B:** Opptak (CO_2 +CA) og oksidasjon av glukose ved forbehandling med butyrat. **C:** Opptak (CO_2 +CA) og oksidasjon av glukose ved forbehandling med propionat. Alle resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm standard feil, $n=6$.

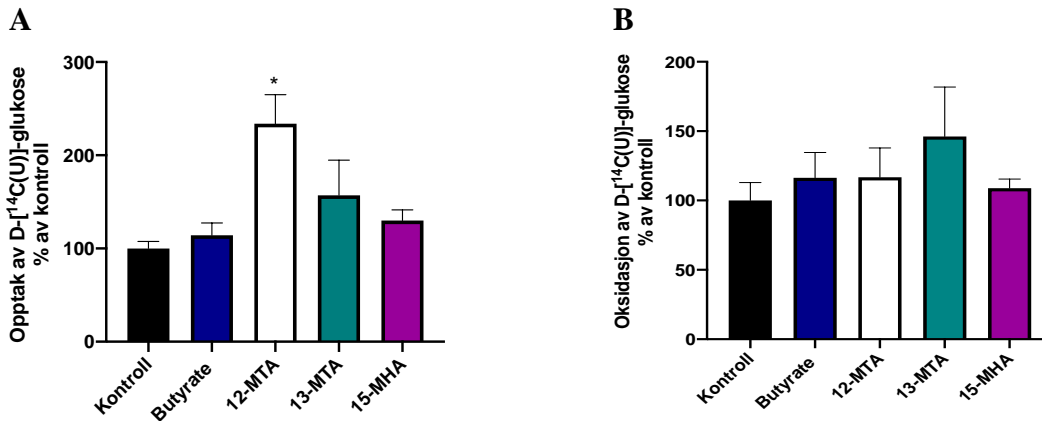


Figur 3.4: Tidsavhengige effekter av kortkjededede fettsyrer på oljesyremetabolisme. På differensieringsdag 4, 6 og 7 ble myotubene forbehandlet med acetat 100 μ M, butyrat 100 μ M og propionat 200 μ M i henholdsvis 96, 48 og 24 timer før forsøksdagen (CO_2 -trapping). Etter forbehandling ble myotubene inkubert i fire timer med 100 μ M [$1\text{-}^{14}\text{C}$] oljesyre (1 $\mu\text{Ci/ml}$). Deretter ble CO_2 produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) målt ved substratoksidasjonsmetoden. **A:** Opptak ($\text{CO}_2\text{+CA}$) og oksidasjon av oljesyre ved forbehandling med acetat. **B:** Opptak ($\text{CO}_2\text{+CA}$) og oksidasjon av oljesyre ved forbehandling med butyrat. **C:** Opptak ($\text{CO}_2\text{+CA}$) og oksidasjon av oljesyre ved forbehandling med propionat. Alle resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm standard feil, $n=6$, $*p<0,05$.

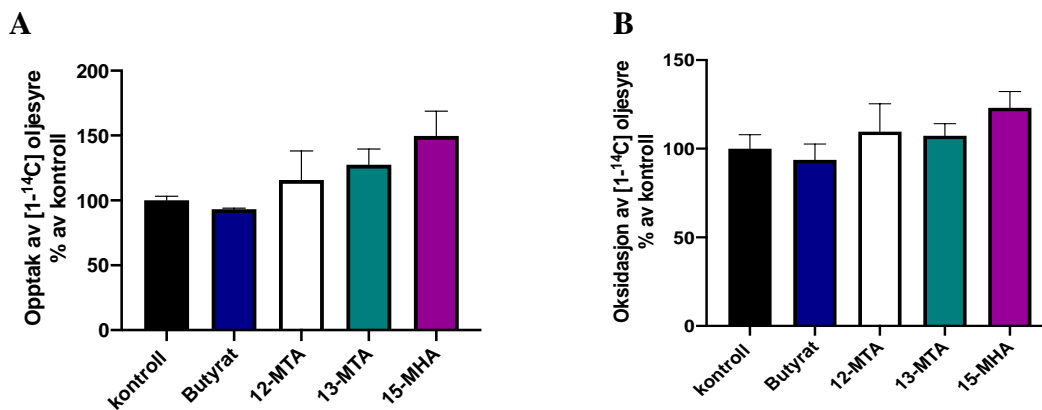
3.3 Effekt av forgrenede fettsyrer på energimetabolisme

Det var også ønskelig å undersøke om forgrenede fettsyrer som 12-metyltertradedekanoat (12-MTA), 13-metyltetradekanoat (13-MTA) og 15-metylheksadekanoat (15 MHA) hadde direkte effekter på glukose- og oljesyremetabolisme i skjelettmuskelceller. For å studere dette ble myotuber forbehandlet med disse forgrenede fettsyrene i en konsentrasjon på 100 μ M i 24 timer. DMSO fortynnet i M3-differensieringsmedium til en endelig konsentrasjon på 0,001% ble benyttet som kontroll, i tillegg ble butyrat 100 μ M inkludert til sammenligning.

Effekt av forgrenede fettsyrer på glukose- og oljesyremetabolisme vises i figur 3.5 og 3.6. 12-MTA førte til en tydelig økning i glukoseopptak som var signifikant sammenlignet med kontrollen (figur 3.5 A). Glukoseoksidasjonen var ikke tilsvarende økt, ingen signifikante effekter på glukoseoksidasjon ble funnet (figur 3.5 B), og dermed førte 12-MTA også til signifikant reduksjon i fraksjonell oksidasjon av glukose (data ikke vist). Det ble ikke funnet noen signifikante effekter av de tre forgrenede fettsyrene på oljesyreoksidasjon og -opptak (figur 3.6).



Figur 3.5: Effekt av forgrenede fettsyrer på glukosemetabolisme. Myotuber ble forbehandlet med forgrenende fettsyrer, 12-metyltertradekanoat (12-MTA), 13-metyltetradekanoat (13-MTA) eller 15-metylheksadekanoat (15-MHA) i en konsentrasjon på 100 μ M i 24 timer. Etter forbehandling ble myotubene inkubert i fire timer med 200 μ M D-[¹⁴C(U)] glukose (1 μ Ci/ml). Deretter ble CO₂ produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) målt ved substratoksidasjonsmetoden. **A:** Opptak av glukose (CO₂+CA) i % av kontroll. **B:** Oksidasjon av glukose til CO₂ i % av kontroll. Alle resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm standard feil, n=3, *p<0,05 sammenlignet med kontroll.



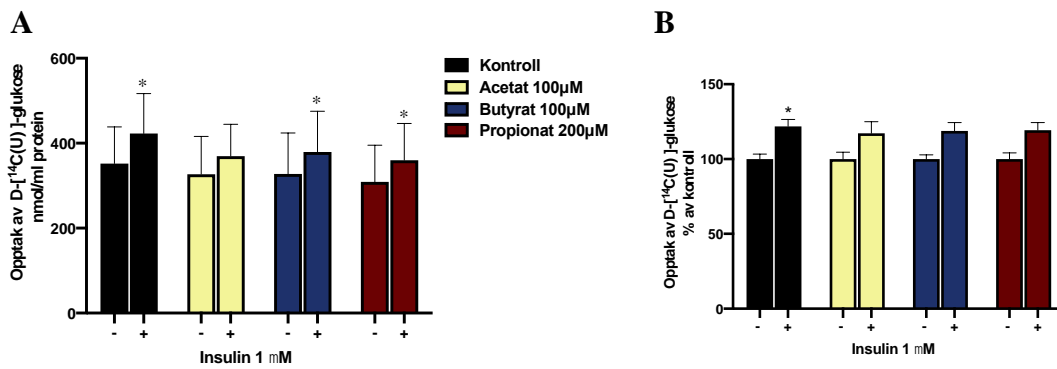
Figur 3.6: Effekt av forgrenede fettsyrer på oljesyremetabolisme. Myotuber ble forbehandlet med forgrenende fettsyrer, 12-metyltertradekanoat (12-MTA), 13-metyltetradekanoat (13-MTA) eller 15-metylheksadekanoat (15-MHA) i en konsentrasjon på 100 μ M i 24 timer. Etter forbehandling ble myotubene inkubert i fire timer med 100 μ M [1-¹⁴C] oljesyre (1 μ Ci/ml). Deretter ble CO₂ produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) målt ved substratoksidasjonsmetoden. **A:** Opptak av oljesyre (CO₂+CA) i % av kontroll. **B:** Oksidasjon av oljesyre til CO₂ i % av kontroll. Alle resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm standard feil, n=3.

3.4 Effekt av forbehandling med kortkjededede og forgrenede fettsyrer på insulin-stimulert glukoseopptak

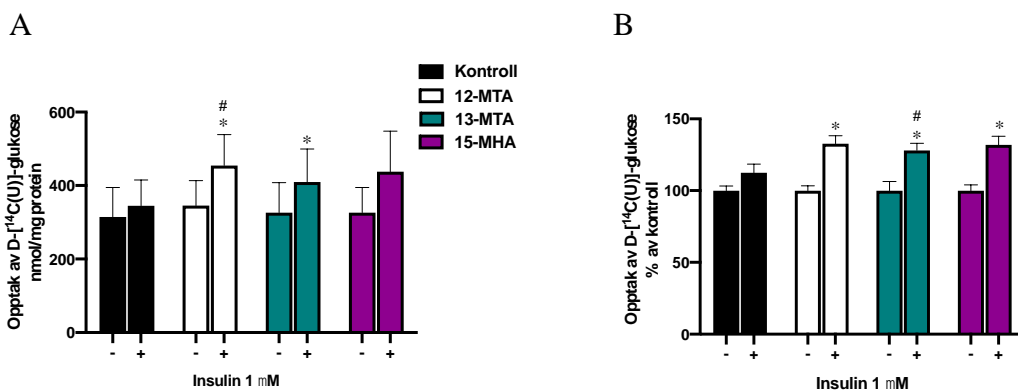
Det var interessant å se om forbehandling med kortkjededede og forgrenede fettsyrer ville påvirke insulin-stimulert glukoseopptak i skjelettmuskelceller. For å undersøke dette ble myotubene forbehandlet med acetat 100 μM , butyrat 100 μM , propionat 200 μM , 12-MTA 100 μM , 13-MTA 100 μM eller 15-MHA 100 μM i 24 timer. M3-differensieringsmedium ble brukt som kontroll for kortkjededede fettsyrer, mens for forgrenede fettsyrer ble det benyttet DMSO fortynnet i M3 til en endelig konsentrasjon på 0,001%. Under trapping ble halvparten av cellene tilsatt 1 μM insulin.

I kontrollceller førte insulin til en signifikant økning på 22 (± 5) % i glukoseopptaket (figur 3.7 A, B). Forbehandling med butyrat 100 μM og propionat 200 μM endret ikke insulinstimulert glukoseopptak, da det var henholdsvis 19 (± 6) % og 19 (± 5) % av ustimulert mens etter forbehandling med acetat 100 μM var ikke insulinresponser signifikante lenger (3.7 A, B).

Forbehandling med 12-MTA, 13-MTA, og 15-MHA i en konsentrasjon på 100 μM sammen med insulin 1 μM ga signifikant økning i glukoseopptak med henholdsvis 33 (± 5) %, 28 (± 5) % og 32 (± 6) % sammenlignet med uten insulin (figur 3.8 B). 12-MTA og 13-MTA førte også til signifikant økning i insulin-stimulert glukoseopptak sammenlignet med kontrollen, men det ble ikke observert noe signifikant effekt av insulin på glukoseopptak i kontrollen (figur 3.8 A, B).



Figur 3.7: Effekt av insulin på glukoseopptak etter forbehandling med kortkjedede fettsyrer. Myotubene ble forbehandlet med kortkjedede fettsyrer acetat 100 µM, butyrat 100 µM eller propionat 200 µM i 24 timer. Deretter ble myotubene inkubert i fire timer med 200 µM D-[¹⁴C(U)] glukose (1 µCi/ml) med og uten insulin (1 µM). CO₂ produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) ble så målt ved substratoksidasjonsmetoden. **A:** Opptak av glukose (CO₂+CA). **B:** Opptak av glukose (CO₂+CA) i % av kontroll. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± standardfeil, n=3, *p<0,05 (signifikant forskjell mellom med og uten insulin).

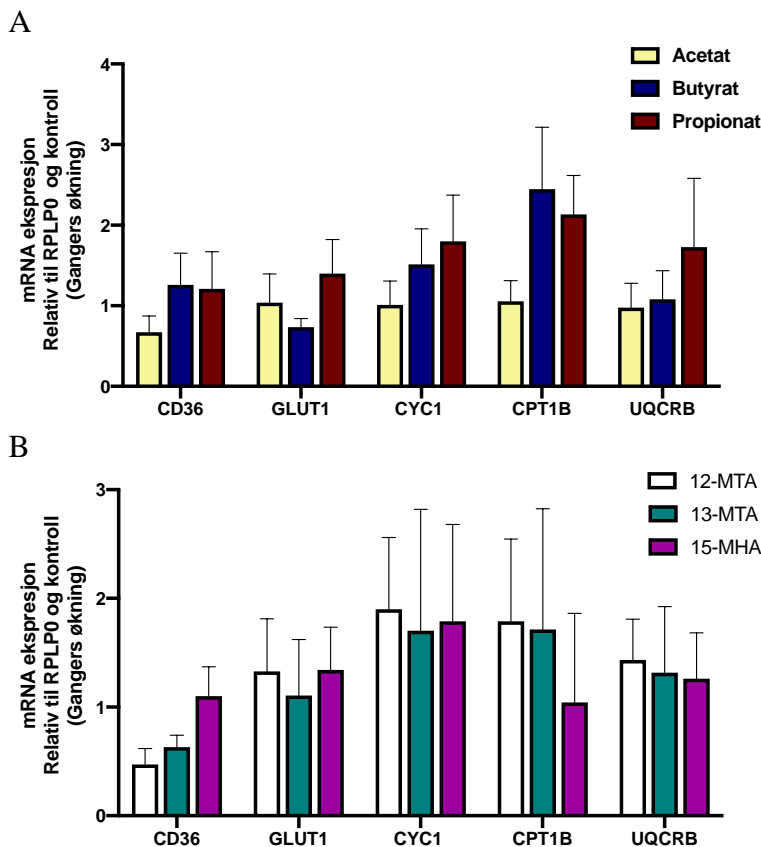


Figur 3.8: Effekt av insulin på glukoseopptak etter forbehandling med forgrenede fettsyrer. Myotubene ble forbehandlet med forgrenede fettsyrer, 12-metyltertradekanoat (12-MTA), 13-metyltetradekanoat (13-MTA) eller 15-metylheksadekanoat (15-MHA) i en konsentrasjon på 100 µM i 24 timer. Etter forbehandling ble myotubene inkubert i fire timer med 200 µM D-[¹⁴C(U)] glukose (1 µCi/ml) med og uten insulin (1 µM). Deretter ble CO₂ produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) målt. **A:** Opptak av glukose (CO₂+CA). **B:** Opptak av glukose (CO₂+CA) i % av kontroll. Alle resultatene er presentert som gjennomsnitt ± standard feil, n=3, *p<0,05 (signifikant forskjell mellom med og uten insulin), #p<0,05 (signifikant forskjell mellom insulinrespons etter forbehandling vs. kontroll).

3.5 Genekspresjon i skjelettmuskelceller etter forbehandling med kortkjedede og forgrenede fettsyrer

For å undersøke om de metabolske effektene av kortkjedede og forgrenede fettsyrer var assosiert med endringer i genekspresjon av relevante gener i skjelettmuskelceller, ble myotuber forbehandlet med ulike konsentrasjoner av fettsyrene i 24 timer før høsting til qPCR. Kortkjedede fettsyrer som ble brukt var acetat 100 μ M, butyrat 100 μ M og propionat 200 μ M. Forgrenede fettsyrer som 12-MTA, 13-MTA og 15-MHA ble brukt i en konsentrasjon på 100 μ M.

Resultater for de genene som ble undersøkt vises i figur 3.9. Gendata fra qPCR for alle genene ble normalisert i forhold til syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0 (RPLP0) som en endogen kontroll og relatert til ubehandlede kontroll. Det ble ikke funnet noe signifikante effekter av verken de kortkjedede fettsyrene (3.9 A) eller forgrenede fettsyrene (3.9 B) på genekspresjon av de studerte genene.

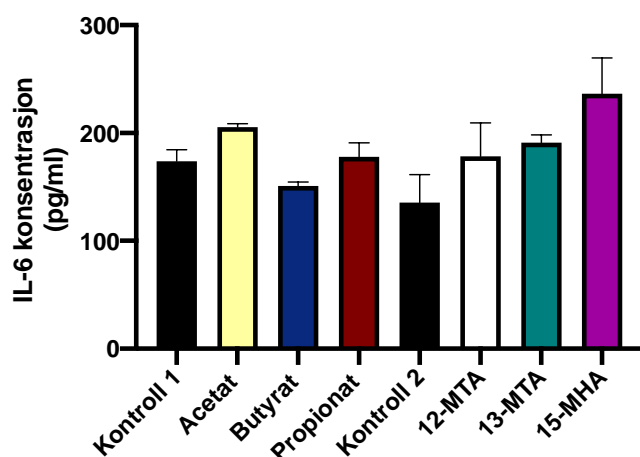


Figur 3.9: Effekt av kortkjedede og forgrenede fettsyrer på genekspressjon. Myotuber ble forbehandlet med kortkjedede (acetat 100 μ M, butyrat 100 μ M eller propionat 200 μ M) og forgrenede fettsyrer (12-MTA, 13-MTA eller 15-MHA 100 μ M) i 24 timer. Total RNA ble isolert, cDNA syntetisert og RT-qPCR ble utført. Ekspressionsdata av de valgte genene ble normalisert i forhold til syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0 (RPLP0) og relatert til kontroll uten tilsatte fettsyrer ved $\Delta\Delta$ Ct-metode. **A:** mRNA ekspressjon etter forbehandling med kortkjedede fettsyrer acetat, butyrat og propionat. **B:** mRNA ekspressjon etter forbehandling med forgrenede fettsyrer 12-MTA (12-metyltertridekanoat), 13-MTA (13-metyltetradekanoat), 15 MHA (15-metylheksadekanoat). Alle resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm standard feil, n=3. CYC1 = cytokrom c1; CPT1B = karnitin-palmitoyltransferase 1B; GLUT1 = glukosetransportør 1; UQCRB = ubiquinol-cytokrom c-reduktase-bindende protein; CD36 = blodplate-glykoprotein 4.

3.6 Myokinsekresjon fra skjelettmuskelceller etter forbehandling med kortkjedede og forgrenede fettsyrer

For å undersøke om kortkjedede og forgrenede fettsyrer har noe effekt på sekresjon av myokiner, som interleukin 6 (IL-6), fra skjelettmuskelceller, ble myotuber forbehandlet med kortkjedede fettsyrer (acetat 100 μ M, butyrat 100 μ M, propionat 200 μ M) og forgrenede fettsyrer (12-MTA, 13-MTA, 15-MHA 100 μ M) i 24 timer. Før høsting av celler til qPCR ble cellemediet tatt av for å måle konsentrasjon av IL-6.

Det ble ikke funnet noe signifikant effekt av kortkjedede fettsyrer på IL-6-sekresjon (figur 3.10). Forgrenede fettsyrer viste en tendens til økt sekresjon av IL-6 sammenlignet med kontrollen, men effektene var ikke signifikante (figur 3.10).



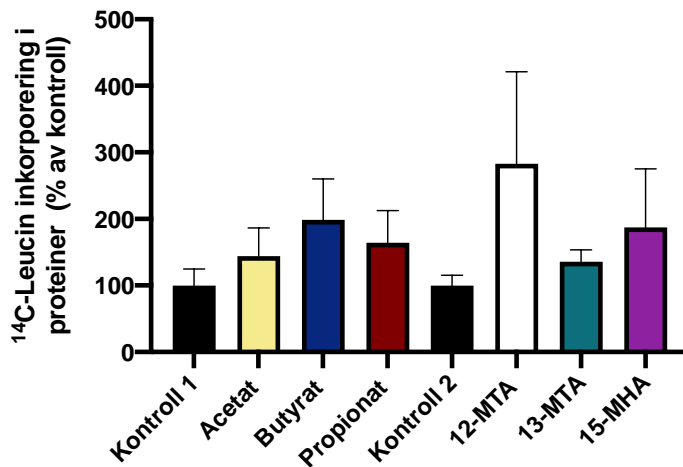
Figur 3.10: Effekt av kortkjedede og forgrenede fettsyrer på sekresjon av interleukin-6 (IL-6). Myotuber ble forbehandlet i 24 timer med kortkjedede fettsyrer (acetat 100 μ M, butyrat 100 μ M, propionat 200 μ M) og forgrenede fettsyrer (12-MTA, 13-MTA, 15-MHA 100 μ M). Før høsting av celler til qPCR ble cellediet tatt av for å måle konsentrasjon av IL-6 ved hjelp av humant IL-6 ELISA kit. Alle resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm standard feil, $n=3$. Kontroll 1 = M3-differensieringsmedium; kontroll 2 = DMSO fortynnet i M3 (0,001%); 12-MTA = 12-metyltertradekanoat; 13-MTA = 13-metyltetradekanoat; 15-MHA = 15-metylheksadekanoat.

3.7 Proteinsyntese i skjelettmuskelceller etter forbehandling med kortkjedede og forgrenede fettsyrer

Det er holdepunkter for at kosttilskudd med leucin-metabolitter som β -hydrokso- β -metylbutyrat (HMB) kan ha gunstige effekter på proteinmetabolisme i muskel, blant annet det å øke muskelmasse og gjenoppretning av muskel etter trening [76, 77]. Det var derfor interessant å studere om kortkjedede og forgrenede fettsyrer påvirker proteinsyntese i skjelettmuskelceller. For å undersøke dette ble differensierte myotuber forbehandlet med kortkjedede fettsyrer (acetat 100 μ M, butyrat 100 μ M og propionat 200 μ M), og forgrenede fettsyrer (12-MTA, 13-MTA og 15-MHA 100 μ M) i 24 timer. Myotubene ble samtidig inkubert med 14 C-leucin (1 μ Ci/ml, 0,8 mM) og inkorporering av 14 C-leucin i proteiner ble målt.

Proteinsyntese etter forbehandling med butyrat 100 μ M synes å være økt sammenlignet med kontrollen, men effekten var ikke signifikant (3.11). Når det gjelder forgrenede fettsyrer, så

var det 12-MTA som viste tendens til økning i proteinsyntese, men denne økningen var heller ikke signifikant og variasjon i datamaterialet var stor (3.11).



Figur 3.11: ¹⁴C-leucin-inkorporering i proteiner etter forbehandling med kortkjedede og forgrenede fettsyrer. Differensierte myotuber ble forbehandlet med kortkjedede fettsyrer (acetat 100 μM, butyrat 100 μM eller propionat 200 μM), og forgrenede fettsyrer (12-MTA, 13-MTA eller 15-MHA 100 μM), og samtidig tilsatt ¹⁴C-leucin (1 μCi/ml, 0,8 mM). Etter 24 timer ble cellene lysert, og proteiner utfelt med 1% BSA i 50% trikloreddiksyre. Proteinpellet som var dannet ble videre løst i SDS-NaOH, og radioaktivitet målt ved hjelp av væskescintillasjon. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± standard feil, n=3. Kontroll 1 = M3-differensieringsmedium; kontroll 2 = DMSO fortynnet i M3 (0,001%), 12-MTA = 12-metyltridekanoat; 13-MTA = 13-metyltetradekanoat; 15-MHA = 15-metylheksadekanoat.

3.8 Effekt av forbehandling med forgrenede fettsyrer på ¹⁴C-leucin inkorporering i cellulære lipider

Det var også ønskelig å undersøke om muskel kan bygge aminosyren leucin inn i lipider og om forgrenede fettsyrer kan påvirke lipogenese fra aminosyren leucin. For å undersøke dette ble inkorporering av ¹⁴C-leucin i varierte lipidklasser etter forbehandling med butyrat og forgrenede fettsyrer studert. Differensierte myotuber ble forbehandlet med butyrat og forgrenede fettsyrer 12-MTA, 13-MTA, 15-MHA i en konsentrasjon på 100 µM i 24 timer, og samtidig tilsatt ¹⁴C-leucin (1 µCi/ml, 0,8 mM). Cellulære lipider ble ekstrahert og separert ved hjelp av tynnsjikt-kromatografi (TLC). M3-differensieringsmedium ble brukt som kontroll for butyrat, mens for forgrenede fettsyrer ble det benyttet DMSO fortynnet i M3 til en endelig konsentrasjon på 0,001%.

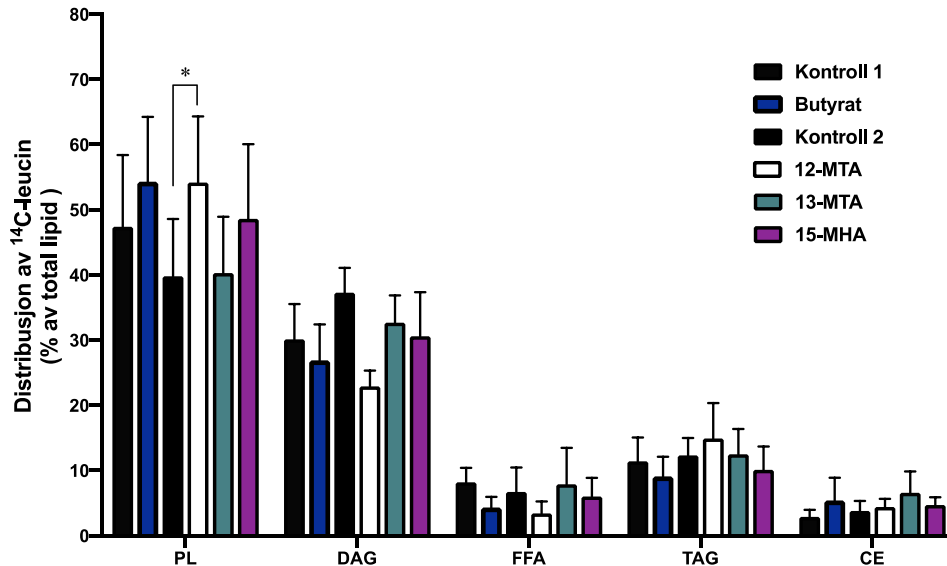
Det viste seg at forbehandling med 12-MTA førte til signifikant økning i fosfolipider (PL), triglyserider, kolesterolster (CE) og total mengde lipider sammenlignet med kontrollen, mens 13-MTA ga signifikant økning i diglyserider (DAG). Butyrat derimot ga signifikant nedgang i frie fettsyrer (FFA) sammenlignet med kontrollen (tabell 3.1).

Tabell 3.1: Inkorporering av ¹⁴C-leucin inn i varierte lipidklasser etter forbehandling med butyrat og forgrenede fettsyrer.

	PL (nmol/mg)	DAG (nmol/mg)	FFA (nmol/mg)	TAG (nmol/mg)	CE (nmol/mg)	Sum lipid (nmol/mg)
Kontroll 1	1,60 ± 0,55	0,74 ± 0,06	0,18 ± 0,04	0,25 ± 0,04	0,06 ± 0,01	2,83 ± 0,56
Butyrat	1,62 ± 0,45	0,60 ± 0,15	0,08 ± 0,04*	0,17 ± 0,04	0,06 ± 0,01	2,53 ± 0,58
Kontroll 2	0,74 ± 0,22	0,55 ± 0,09	0,07 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,04 ± 0,01	1,56 ± 0,30
12-MTA	3,80 ± 1,55*	1,04 ± 0,34	0,04 ± 0,01	0,44 ± 0,15*	0,15 ± 0,05*	5,47 ± 2,10*
13-MTA	2,12 ± 0,72	1,45 ± 0,48*	0,05 ± 0,01	0,30 ± 0,10	0,08 ± 0,02	4,00 ± 1,24
15-MHA	2,30 ± 0,87	0,75 ± 0,20	0,06 ± 0,02	0,30 ± 0,14	0,11 ± 0,04	3,52 ± 1,20

Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± standard feil, n=3, *p<0,05. Kontroll 1 = M3-differensieringsmedium; kontroll 2 = DMSO fortynnet i M3 (0,001%); 12-MTA = 12-metyltridekanoat; 13-MTA = 13-metyltetradekanoat; 15-MHA = 15-metylheksadekanoat; PL = fosfolipider; DAG = diacylglyserol; FFA = frie fettsyrer; TAG = triacylglyserol; CE = kolesterolster.

Resultatene fra % av total lipid viste at forbehandling med butyrat og forgrenede fettsyrer førte til høyest inkorporering av ^{14}C -leucin i fosfolipider (PL), etterfulgt av diglyserider (DAG) og triglyserider (TAG), mens nivåene var lavest for frie fettsyrer (FFA) og kolesterolester (CE) (figur 3.12).



Figur 3.12: Lipiddistribusjon målt som inkorporering av ^{14}C -leucin i cellulære lipider (PL, DAG, FFA, TAG og CE) etter forbehandling med butyrat og forgrenede fettsyrer. Differensierte myotuber ble forbehandlet med butyrat, 12-MTA, 13-MTA og 15-MHA i en konsentrasjon på 100 μM i 24 timer, og samtidig inkubert med ^{14}C -leucin (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 0.8 mM). Etter 24 timer ble lipider ekstrahert og separert ved bruk av tynnsjikt-kromatografi (TLC) og radioaktivitet målt vha. væskescintillasjon. Resultatene er presentert som % av totale lipid (sum av alle lipidklasser), $n=3$, $*p<0,05$. Kontroll 1=M3-differensieringsmedium; kontroll 2 = DMSO fortynnet i M3 (0,001%); 12-MTA = 12-metyltridekanoat; 13-MTA = 13-metyltetradekanoat; 15-MHA = 15-metylheksadekanoat; PL = fosfolipider; DAG = diacylglyserol; FFA = frie fettsyrer; TAG = triacylglyserol; CE = kolesterolester.

4 Diskusjon

Denne oppgaven presenterer mulige effekter av kortkjedede og forgreinede fettsyrer på blant annet energimetabolisme, proteinsyntese, myokinsekresjon og lipiddistribusjon i skjelettmuskelceller. Av kortkjedede fettsyrer (SCFA) ble det funnet signifikante effekter av butyrat 100 μM etter 24 timer forbehandling på blant annet glukoseopptak og oljesyreopptak og -oksidasjon. Når det gjelder forgreinede fettsyrer (BCFA) så var det 12-MTA som viste en tydelig økning i glukoseopptak uten å ha noe effekt på verken glukoseoksidasjon eller oljesyremetabolisme. Det ble også observert effekt av BCFA på inkorporering av ^{14}C -leucin i cellulære lipider. Derimot ble det ikke funnet noe effekt av disse fettsyrene på verken proteinsyntese eller sekresjon av interleukin-6 (IL-6).

4.1 Vurdering av metodikken

For å kunne studere effekter av kortkjedede og forgreinede fettsyrer i skjelettmuskel ble satellittceller isolert fra muskelbiopsier og celler fra passasje 3 og 4 benyttet. Cellene ble dyrket opp til myoblaster og videre differensiert til flerkjernede myotuber. Myotuber i kultur er en velegnet *in vitro*-modell for studier av human skjelettmuskulatur siden de har liknende egenskaper som skjelettmuskel *in vivo* [7, 8]. De kan ha relevant genetisk bakgrunn som gir mulighet for å studere blant annet metabolske egenskaper. Myotuber har likevel en del begrensninger som må trekkes inn. Siden de er i kultur så mangler de *in vivo* mikromiljø og dermed kommunikasjon og samspill med andre celler og vev. Myotuber viser seg å være mindre insulinsensitive enn intakt skjelettmuskel, sannsynligvis pga. lavere ekspresjon av glukosetransportør 4 (GLUT4) [78]. Derfor brukes det ofte insulin i konsentrasjoner på 0,1-1 μM i studier av humane myotuber. Denne modellen er likevel mer relevant for humane studier enn bruk av dyreceller, isolert fra blant annet rotte eller mus [7].

Under differensiering av satellittceller til myotuber ble det sett tendens til at celler fra en donor oppførte seg ulikt, med hensyn på proliferasjonshastighet og differensieringsevne. Det var ikke uventet at isolerte celler fra ulike individer ville oppføre seg ulikt. Dette kunne bidra til at forsøkene ble utført med ulikt antall myotuber, og dermed påvirke resultatene.

Betydning av variasjonen i antall myotuber ble redusert ved å relatere data mot proteinmengde som mål på antall celler, men individuelle forskjeller kunne fortsatt være der.

I substratoksidasjonsforsøkene ble radiomerket glukose og oljesyre tilsatt myotubene for å undersøke energimetabolismen, hvorav substratoksidasjon ble kvantifisert i form av radiomerket karbondioksid ($^{14}\text{CO}_2$) og substratopptak som summen av $^{14}\text{CO}_2$ og celleassosiert radioaktivitet (^{14}CA). Denne metoden er utviklet av Wensaas et al. [71] og er godt validert. Bradford metode som er en veletablert og god validert metode ble benyttet til å kvantifisere total proteinmengde i cellelysater [72]. RT-qPCR ble benyttet for å studere genuttrykk av noen relevante gener *in vitro*, der syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0 (RPLP0) ble brukt som endogen kontroll. RPLP0 er et såkalt «housekeeping gene» som ble valgt ut på bakgrunn av at det uttrykkes stabilt i alle celler og er tidligere benyttet i studier av skjelettmuskelceller [75]. Denne metoden er utviklet av Mullis et al. [73] og er en godt etablert metode. For måling av interleukin-6 (IL-6) i cellemedium ble det benyttet ELISA, en godt validert og veletablert metode som egner seg til måling av en analytt per prøve [79]. ^{14}C -leucin-inkorporering i proteiner ble brukt som et mål på proteinsyntese i skjelettmuskelceller. Lipiddistribusjon ble studert ved hjelp av tynnsjikt-kromatografi, et godt etablert metode som ble først beskrevet av Folch et al. [80].

4.2 Effekter av kortkjedede og forgreinede fettsyrer på energimetabolisme

I denne oppgaven ble det undersøkt direkte effekter av kortkjedede fettsyrer (SCFA) og forgreinede fettsyrer (BCFA) på glukose- og oljesyremetabolisme i skjelettmuskelceller i kultur. Det ble gjort konsentrasjonsavhengighetsforsøk for SCFA, der acetat ble prøvd ut i konsentrasjonene 100, 500 og 1000 μM mens butyrat og propionat i konsentrasjonene 10, 100 og 200 μM . Dette var basert på tilgjengelige humane intervensjonsstudier som har undersøkt plasmakonsentrasjon av SCFA, hvorav acetat hadde høyest perifert konsentrasjon (19-160 μM) sammenlignet med propionat (1-13 μM) og butyrat (1-12 μM) [45, 52, 53]. I dette forsøket var det kun butyrat 100 μM som viste signifikant økning av glukoseopptak og oljesyreopptak og -oksidasjon. Andre SCFA som propionat 200 μM og acetat 100 μM viste kun signifikant effekt på fraksjonell oksidasjon av oljesyre.

Per i dag er det så vidt vi vet ingen studier har undersøkt direkte effekter av SCFA på energimetabolisme i humane skjelettmuskelceller i kultur. Derimot finnes det en del *in vivo* studier, i muse- og rottemodeller og humane intervensjonsstudier som har sett på mulige effekter av disse kortkjedede fettsyreene i skjelettmuskel. I en musemodell med kostholds-

indusert overvekt, 16 uker med butyrat og fettriikt kost førte til blant annet vektreduksjon og økt insulinsensitivitet sammenlignet med fettriikt kost alene. Forklaring til disse funnene var blant annet økt fettsyreoksidasjon i skjelettmuskulatur [59]. I overvektige rotter førte injeksjon av acetat i 6 måneder til økt uttrykk av gener involvert i glukosemetabolisme som GLUT4 [57]. Disse studier indikerer at SCFA som acetat og butyrat kan ha direkte effekter på glukose- og fettsyremetabolisme i skjelettmuskel og dermed være med på å forbedre insulinsensitivitet [45, 57, 59]. Canfora et al. fant at rektalt administrasjon av en blanding med SCFA, som acetat, butyrat og propionat, økte fastende fettsyreoksidasjon og hvilende energiforbruk, dette korrelert med økte nivåer av sirkulerende acetatkonsentrasjon [81].

For å undersøke tidsavhengige effekter av SCFA, ble det valgt ut noen konsentrasjoner av de ulike SCFA basert på signifikante effekter etter 24 timer og disse konsentrasjonene ble gitt til myotuber i henholdsvis 24, 48 og 96 timer før CO₂-tapping. Resultater fra tidsavhengighetsforsøket var ikke som forventet basert på observasjonene i konsentrasjonsavhengighetsforsøket. Resultatene fra konsentrasjonsavhengighetsforsøket ved 24 timer lot seg ikke reprodusere, og eventuelle effekter, særlig av butyrat på oljesyreoksidasjon, gikk i motsatt retning. Imidlertid må det sies at i akkurat disse forsøkene ble det av ukjent grunn registrert veldig lave telletall, slik at forsøkene er beheftet med en stor usikkerhet.

Av forgreinede fettsyrer som 12-MTA, 13-MTA og 15 MHA, viste 12-MTA en tydelig økning i glukoseopptak og reduksjon i fraksjonell oksidasjon uten å ha noe signifikant effekt på glukoseoksidasjonen. Det var forventet å få økt glukoseoksidasjon siden opptaket var så høyt. Av erfaring vet vi at i skjelettmuskelceller følger glukoseoksidasjonen glukoseopptaket veldig tett [82], men ikke i dette tilfellet og dermed var fraksjonell oksidasjon redusert etter forbehandling med 12-MTA. Det ble ikke sett noe signifikant effekt av disse BCFA på fettsyremetabolismen. Som nevnt tidligere, det finnes veldig lite informasjon om effekten av BCFA hos mennesker, men de blir ofte behandlet som andre langkjedede fettsyrer når det gjelder absorpsjon, transport og metabolisme [65]. Det er uvisst om disse fettsyrene virker som substrater for energi og kan interferere i biokjemiske prosesser i cellen på den måte, eller om de har andre måter å virke på, som for eksempel via reseptorer, intracellulære signalveier og endret genekspressjon [83].

Når det gjelder effekt av SCFA på insulin-stimulert glukoseopptak, så førte insulin til økt glukoseopptak i kontrollceller og insulinresponser endret seg ikke etter forbehandling med butyrat 100 μ M og propionat 200 μ M mens ved forbehandling med acetat 100 μ M var ikke insulinresponser signifikante lenger. Imidlertid kan man ikke si at SCFA påvirker insulin-stimulert glukoseopptak siden de ikke viste noen signifikante effekter sammenlignet med kontroll. BCFA som 12-MTA, 13-MTA og 15-MHA ga signifikant økning i glukoseopptak sammen med insulin. 12-MTA, 13-MTA førte også til signifikant økning i insulin-stimulert glukoseopptak sammenlignet med kontroll, men siden det ble ikke observert noe signifikant effekt av insulin på glukoseopptak i kontrollen kan man ikke si at SCFA øker insulin-stimulert glukoseopptak.

4.3 Andre effekter av kortkjedede og forgreinede fettsyrer på skjelettmuskelceller

Det ble undersøkt sekresjon av interleukin-6 (IL-6) fra skjelettmuskelceller etter forbehandling med SCFA og BCFA. IL-6 er en kjent myokin, hvorav produksjon er særlig avhengig av muskelkontraksjon både på protein- og gennivå [84]. Resultater fra dette forsøket viste at verken SCFA eller BCFA hadde noe effekt på sekresjon av IL-6. En del humane intervensjonsstudier har demonstrert at kortkjedede fettsyrer som acetat, butyrat og propionat kan vise anti-inflammatoriske egenskaper sannsynligvis ved å øke sekresjon av cytokiner [85], men man vet ikke hvilke typer cytokiner det er snakk om og hvilke mekanismer som ligger bak. Canfora et al. undersøkte effekt av en blanding med acetat, butyrat og propionat på systemisk inflammasjon etter rektal administrasjon. Der det ble ikke funnet noen signifikante endringer i plasmakonsentrasjon av IL-6 [81].

Så vidt vi vet har ingen studier undersøkt direkte effekter av SCFA og BCFA på proteinmetabolisme i skjelettmuskel. En del *in vivo* dyrestudier har demonstrert evnen til SCFA til å påvirke skjelettmuskelmasse. En studie rapporterte at tilskudd med butyrat over en periode med 40 uker kunne opprettholde muskelmasse under aldringsprosessen hos mus [86]. Det er også holdepunkter for at leucin-metabolitter som β -hydrokso- β -metylbutyrat (HMB) fra kosten kan påvirke proteinmetabolisme i muskel og dermed øke muskelmasse [76, 77]. Andre studier som Kondo et al. og Henagan et al. fant imidlertid ingen forskjell i skjelettmuskelmasse etter tilskudd av acetat og butyrat til musmodellert med høyfettdiett [87, 88]. På grunn av uklare *in vivo* effekter var det ønskelig å undersøke proteinsyntese i skjelettmuskelceller etter forbehandling med SCFA og BCFA. Dette ble gjort ved å inkubere

celler med ^{14}C -leucin og studere inkorporering i proteiner. Det ble ikke sett noen signifikante effekter av verken SCFA eller BCFA på proteinsyntese under de gitte forhold.

Det vi imidlertid observerte var effekt av BCFA på inkorporering av ^{14}C -leucin i cellulære lipider. Det ble observert signifikant økning i inkorporering av leucin i fosfolipider (PL), triglyserider (TAG), kolesterolester (CE) og total mengde lipider ved forbehandling med 12-MTA og signifikant økt inkorporering i diglyserider (DAG) ved forbehandling med 13-MTA. Dette kan tyde på at BCFA som 12-MTA og 13-MTA kan ha en mulig effekt på lipogenese fra aminosyre som substrat i skjelettmuskelceller. Dette har ikke blitt studert tidligere så vidt vi vet, men studier viser at leucin som er en forgreinede aminosyre (BCAA) kan ha ulike metabolske veier, blant annet som substrat i proteinsyntese, oksidasjon og *de novo* lipogenese, der syntese av lipider kan skje via generering av mellomprodukter til Krebs syklusen, inkludert acetyl-CoA [89, 90]. Derfor ble det undersøkt om BCFA kan påvirke lipogenese ved å inkorporere ^{14}C -leucin i cellulære lipider.

4.4 Mulige mekanismer bak observerte effekter av kortkjedede og forgreinede fettsyrer

For å forsøke å finne ut noe om mekanismen bak de observerte metabolske effektene av SCFA og BCFA, ble relativ genekspressjon av utvalgte gener involvert i energimetabolisme i skjelettmuskel undersøkt. De utvalgte genene spiller viktige roller i blant annet opptak av FFA (CD36/FAT), glukoseopptak (GLUT1), opptak av langkjedet acyl-CoA til mitokondrier (CPT1B) og som underenheter for kompleks III i elektrontransportkjeden (CYC1, UQCRB) [16, 26, 30, 91, 92]. Resultatene presentert i denne oppgaven viste ingen signifikant endring i ekspressjon av disse genene etter 24 timers forbehandling med SCFA og BCFA. Det betyr at de metabolske effektene som ble observert av SCFA og BCFA ikke kan forklares med endret uttrykk av de respektive genene.

Basert på observasjonene fra konsentrasjonsavhengighetsforsøket var det forventet å få økt genuttrykk av blant annet GLUT1 og CD36. Økt uttrykk av GLUT1 kunne kanskje forklare økt glukoseopptak etter forbehandling med butyrat og 12-MTA, og økt uttrykk av CD36 kunne forklare økt oljesyreopptak etter forbehandling med butyrat. Det var kanskje ikke uventet at uttrykk av CPT1B, CYC1 og UQCRB ikke var endret siden det ble observert få effekter på oksidasjon av glukose og oljesyre. Imidlertid må det sies at 24 timer forbehandling kan kanskje være kort tid for å få endringer på gennivå.

Mekanismer og signalveier bak effektene av SCFA og BCFA er fortsatt ukjent. En mulig mekanisme for SCFA kan være via SCFA-reseptorsignalisering siden de G-proteinkoblede reseptorene GPR41 og GPR43 er vist å være reseptorer for SCFA [45, 50]. Tidligere microarray-data fant ut at blant annet GPR43 er uttrykt i humane myotuber [62]. Aktivisering av disse reseptorene kan utløse en signaleringskaskade som fører til blant annet aktivering av AMPK, en kjent regulator av metabolsk homeostase [50, 93]. Aktivisering av AMPK kan føre til økt fettsyreoksidasjon ved å trigge ekspresjon av PGC1 α , som videre regulerer aktivitet til blant annet PPAR-transkripsjonsfaktorer. Aktivert AMPK kan også påvirke glukoseopptak, muligens via GLUT4 transportør [45]. Antageligvis kan SCFA og BCFA virke som energisubstrater ved at de tas opp og innvirker på biokjemiske prosesser i cellene. Det har blitt estimert at en stor andel av SCFA blir brukt som energikilde når de tas opp i celler, og dette gir ca. 10 % av vårt daglige kaloribehov [94]. Basert på *in vivo* dyrestudier ble det anslått at SCFA som acetat, butyrat og propionat kan spille en viktig rolle som substrater for glukose- og lipidmetabolisme, butyrat som energisubstrat for kolonocytters mens acetat og propionat for perifere vev [50, 95]. Hva det igjen gjør med evnen til å metabolisere andre energisubstrater er uklart.

5 Konklusjon

Det ble funnet direkte effekter av butyrat 100 μ M på oljesyremetabolisme og glukoseopptak i skjelettmuskelceller. Dette kan indikere en mulig rolle av butyrat på energimetabolisme i skjelettmuskel. Når det gjelder forgreinede fettsyrer så var det 12-MTA som viste effekt på glukoseopptak uten å ha noe effekt på glukoseoksidasjon eller oljesyremetabolisme. Kortkjedede og forgreinede fettsyrer hadde ikke noe effekt på insulin-stimulert glukoseopptak. Videre ble genekspresjon av utvalgte, relevante gener involvert i energimetabolisme ikke påvirket etter forbehandling med kortkjedede og forgreinede fettsyrer. Disse fettsyrene viste heller ingen effekt på verken proteinsyntese eller sekresjon av interleukin- 6 (IL-6) fra skjelettmuskelceller. Forgreinede fettsyrer, særlig 12-MTA og 13-MTA hadde effekt på inkorporering av 14 C-leucin i cellulære lipider i skjelettmuskelceller. Dette kan indikere at BCFA kan ha en rolle i lipogenese i skjelettmuskel.

Veien videre

Resultatene presentert i denne oppgaven gir en indikasjon til mulige roller av SCFA og BCFA på energimetabolisme i skjelettmuskel som kan være interessant å fortsette å forske på.

I denne studien ble det brukt muskelceller fra friske, frivillige donorer for å undersøke effekter av SCFA og BCFA på energimetabolisme. Kanskje kunne man se tydeligere effekter dersom cellene var fra overvektige eller diabetikere, eller at cellene var gjort insulinresistente på en eller annen måte. Mekanismer og signalveier bak disse effektene er ukjent, så det ville vært interessant å undersøke nærmere AMPK-aktivitet for eksempel. Det hadde også vært interessant å se om SCFA kan metaboliseres i muskel ved å inkubere muskelceller med radiomerket SCFA, og se hvordan disse kortkjedede fettsyrene håndteres intracellulært, om de tas opp og oksideres. Man vet veldig lite om metabolisme og skjebnen til BCFA hos mennesker derfor kan det være et viktig forskningsområdet.

Funnene som kommer fram av denne studien kan ha nytteverdi for blant annet kostholdsveiledning. Sammenheng mellom kosthold, tarmflora og utvikling av metabolske sykdommer som fedme og type 2-diabetes er en stor fokusområdet i dagens forskning. Fiberrikt kost kan være en av de faktorene som påvirker sammensetning av tarmflora og generering av kostkjedede fettsyrer (SCFA), som kan videre spille en viktig rolle i energimetabolisme i skjelettmuskel og dermed utvikling av metabolske sykdommer. Forgreinede fettsyrer (BCFA) får man mest via meieriprodukter som er en naturlig del av et sunt kosthold. Positive helseeffekter av meieriprodukter kan være forbundet med blant annet tilstedeværelse av BCFA, men det trenges mer forskning på dette området for å få mer nyansert syn på helseeffektene og mengder som skal anbefales.

Litteraturliste

1. Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int.* 2015;96(3):183-95.
2. Ten Broek RW, Grefte S, Von den Hoff JW. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. *Journal of cellular physiology.* 2010;224(1):7-16.
3. Sand O, Sjaastad ØV, Haug E, Toverud KC. *Muskulene. Mennesketes fysiologi.* 2 ed. Oslo: Gyldendal Norsk Forlag; 2014. p. 325-47.
4. Youngxu W. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR δ . *PLoS Biology.* 2004;2(10):1532-8.
5. Tanner CJ, Barakat HA, Dohm GL, Pories WJ, MacDonald KG, Cunningham PR, et al. Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* 2002;282(6):E1191-E6.
6. Lillioja S, Young AA, Culter CL, Ivy JL, Abbott W, Zawadzki JK, et al. Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man. *The Journal of clinical investigation.* 1987;80(2):415-24.
7. Aas V, Bakke SS, Feng YZ, Kase ET, Jensen J, Bajpeyi S, et al. Are cultured human myotubes far from home? *Cell Tissue Res.* 2013;354(3):671-82.
8. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev.* 2013;93(1):23-67.
9. Gaster M, Kristensen S, Beck-Nielsen H, Schrøder H. A cellular model system of differentiated human myotubes. *Apmis.* 2001;109(11):735-44.
10. Frampton J, Murphy KG, Frost G, Chambers ES. Short-chain fatty acids as potential regulators of skeletal muscle metabolism and function. *Nature Metabolism.* 2020:1-9.
11. Periasamy M, Herrera JL, Reis FC. Skeletal muscle thermogenesis and its role in whole body energy metabolism. *Diabetes & metabolism journal.* 2017;41(5):327.
12. Thoresen GH, Hessvik NP, Bakke SS, Aas V, Rustan A. Metabolic switching of human skeletal muscle cells in vitro. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA). 2011;85(5):227-34.
13. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;414(6865):799-806.
14. Tremblay F, Dubois M-J, Marette A. Regulation of GLUT4 traffic and function by insulin and contraction in skeletal muscle. *Front Biosci.* 2003;8(12):1072-84.

15. Joost H-G, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Molecular membrane biology*. 2001;18(4):247-56.
16. Khan A, Pessin J. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia*. 2002;45(11):1475-83.
17. Chang L, Chiang S-H, Saltiel AR. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Molecular medicine*. 2004;10(7):65-71.
18. Richter EA, Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiological reviews*. 2013.
19. Abbott MJ, Edelman AM, Turcotte LP. CaMKK is an upstream signal of AMP-activated protein kinase in regulation of substrate metabolism in contracting skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2009;297(6):R1724-R32.
20. Watt MJ. Storing up trouble: does accumulation of intramyocellular triglyceride protect skeletal muscle from insulin resistance? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2009;36(1):5-11.
21. Ferrier DR. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. 6 ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2014.
22. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. *Essential cell biology*. 4 ed: Garland Science; 2014.
23. Turner N, Cooney GJ, Kraegen EW, Bruce CR. Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle. *Journal of Endocrinology*. 2014;220(2):T61-T79.
24. Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu ZB. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. *International journal of molecular medicine*. 2019;44(1):3-15.
25. Zhang L, Keung W, Samokhvalov V, Wang W, Lopaschuk GD. Role of fatty acid uptake and fatty acid β -oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2010;1801(1):1-22.
26. Schwenk RW, Holloway GP, Luiken JJ, Bonen A, Glatz JF. Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*. 2010;82(4-6):149-54.
27. Holloway GP, Schwenk RW, Luiken JJ, Glatz JF, Bonen A. Fatty acid transport in skeletal muscle: role in energy provision and insulin resistance. *Clinical Lipidology*. 2010;5(5):731-45.

28. Luiken JJ, Dyck DJ, Han X-X, Tandon NN, Arumugam Y, Glatz JF, et al. Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 2002;282(2):E491-E5.
29. Aas V, Rokling-Andersen M, Wensaas A, Thoresen G, Kase E, Rustan A. Lipid metabolism in human skeletal muscle cells: effects of palmitate and chronic hyperglycaemia. *Acta physiologica Scandinavica*. 2005;183(1):31-41.
30. He L, Kim T, Long Q, Liu J, Wang P, Zhou Y, et al. Carnitine palmitoyltransferase-1b deficiency aggravates pressure overload–induced cardiac hypertrophy caused by lipotoxicity. *Circulation*. 2012;126(14):1705-16.
31. Kiens B, Alsted T, Jeppesen J. Factors regulating fat oxidation in human skeletal muscle. *Obesity reviews*. 2011;12(10):852-8.
32. Grundy SM, Brewer Jr HB, Cleeman JI, Smith Jr SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004;109(3):433-8.
33. Boulange CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas ME. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Med*. 2016;8(1):42.
34. Engin A. The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome. *Obesity and lipotoxicity*. 2017:1-17.
35. Organization WH. Obesity and overweight. 2020.
36. Sung H, Siegel RL, Torre LA, Pearson-Stuttard J, Islami F, Fedewa SA, et al. Global patterns in excess body weight and the associated cancer burden. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2019;69(2):88-112.
37. Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas M-E. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome medicine*. 2016;8(1):1-12.
38. Kusunoki J, Kanatani A, Moller DE. Modulation of fatty acid metabolism as a potential approach to the treatment of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine*. 2006;29(1):91-100.
39. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840-6.
40. Larsen N, Vogensen FK, Van Den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS one*. 2010;5(2):e9085.

41. Carvalho BM, Abdalla Saad MJ. Influence of gut microbiota on subclinical inflammation and insulin resistance. *Mediators of inflammation*. 2013;2013.
42. Hurrle S, Hsu WH. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomedical Journal*. 2017;40(5):257-62.
43. Kraegen EW, Cooney GJ, Turner N. Muscle insulin resistance: a case of fat overconsumption, not mitochondrial dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(22):7627-8.
44. McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in dermatology*. 2018;36(1):14-20.
45. Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Reviews Endocrinology*. 2015;11(10):577.
46. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JF, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*. 2012;143(4):913-6. e7.
47. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012;490(7418):55-60.
48. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. 2013;498(7452):99-103.
49. Wang J, Jia H. Metagenome-wide association studies: fine-mining the microbiome. *Nature Reviews Microbiology*. 2016;14(8):508-22.
50. Den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud D-J, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research*. 2013;54(9):2325-40.
51. Machate DJ, Figueiredo PS, Marcelino G, Guimaraes RCA, Hiane PA, Bogo D, et al. Fatty Acid Diets: Regulation of Gut Microbiota Composition and Obesity and Its Related Metabolic Dysbiosis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11).
52. Bloemen JG, Venema K, van de Poll MC, Damink SWO, Buurman WA, Dejong CH. Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery. *Clinical nutrition*. 2009;28(6):657-61.
53. Bloemen JG, Damink SWO, Venema K, Buurman WA, Jalan R, Dejong CH. Short chain fatty acids exchange: is the cirrhotic, dysfunctional liver still able to clear them? *Clinical nutrition*. 2010;29(3):365-9.

54. Cherbut C, Ferrier L, Rozé C, Anini Y, Blottière H, Lecannu G, et al. Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1998;275(6):G1415-G22.
55. Tazoe H, Otomo Y, Kaji I, Tanaka R, Karaki S, Kuwahara A. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59(Suppl 2):251-62.
56. Wu H, Ballantyne CM. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(1):43-54.
57. Yamashita H, Maruta H, Jozuka M, Kimura R, Iwabuchi H, Yamato M, et al. Effects of acetate on lipid metabolism in muscles and adipose tissues of type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2009;73(3):570-6.
58. Fushimi T, Tayama K, Fukaya M, Kitakoshi K, Nakai N, Tsukamoto Y, et al. Acetic acid feeding enhances glycogen repletion in liver and skeletal muscle of rats. *The Journal of nutrition*. 2001;131(7):1973-7.
59. Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*. 2009;58(7):1509-17.
60. Myhrstad MC, Tunsjø H, Charnock C, Telle-Hansen VH. Dietary fiber, gut microbiota, and metabolic regulation—Current status in human randomized trials. *Nutrients*. 2020;12(3):859.
61. Zhao L, Zhang F, Ding X, Wu G, Lam YY, Wang X, et al. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science*. 2018;359(6380):1151-6.
62. Feng YZ, Nikolić N, Bakke SS, Boekschoten MV, Kersten S, Kase ET, et al. PPAR δ activation in human myotubes increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity and reduces glucose utilization by a switch in substrate preference. *Archives of physiology and biochemistry*. 2014;120(1):12-21.
63. Moran BM, Flatt PR, McKillop AM. G protein-coupled receptors: signalling and regulation by lipid agonists for improved glucose homeostasis. *Acta diabetologica*. 2016;53(2):177-88.
64. Hu J, Lin S, Zheng B, Cheung PC. Short-chain fatty acids in control of energy metabolism. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2018;58(8):1243-9.
65. Taormina VM, Unger AL, Schiksnis MR, Torres-Gonzalez M, Kraft J. Branched-Chain Fatty Acids—An Underexplored Class of Dairy-Derived Fatty Acids. *Nutrients*. 2020;12(9):2875.

66. Dingess KA, Valentine CJ, Ollberding NJ, Davidson BS, Woo JG, Summer S, et al. Branched-chain fatty acid composition of human milk and the impact of maternal diet: the Global Exploration of Human Milk (GEHM) Study. *The American journal of clinical nutrition*. 2017;105(1):177-84.
67. Wallace M, Green CR, Roberts LS, Lee YM, McCarville JL, Sanchez-Gurmaches J, et al. Enzyme promiscuity drives branched-chain fatty acid synthesis in adipose tissues. *Nature chemical biology*. 2018;14(11):1021-31.
68. Mika A, Stepnowski P, Kaska L, Proczko M, Wisniewski P, Sledzinski M, et al. A comprehensive study of serum odd-and branched-chain fatty acids in patients with excess weight. *Obesity*. 2016;24(8):1669-76.
69. Pakiet A, Wilczynski M, Rostkowska O, Korczynska J, Jabłonska P, Kaska L, et al. The effect of one anastomosis gastric bypass on branched-chain fatty acid and branched-chain amino acid metabolism in subjects with morbid obesity. *Obesity surgery*. 2020;30(1):304-12.
70. Liu L, Xiao D, Lei H, Peng T, Li J, Cheng T, et al. Branched-chain fatty acids lower triglyceride levels in a fatty liver model in vitro. *The FASEB Journal*. 2017;31:969.4-.4.
71. Wensaas A, Rustan A, Löfstedt K, Kull B, Wikström S, Drevon C, et al. Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation. *Journal of lipid research*. 2007;48(4):961-7.
72. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72(1-2):248-54.
73. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*. 2006;27(2-3):95-125.
74. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*. 2001;25(4):402-8.
75. Nikolić N, Bakke SS, Kase ET, Rudberg I, Halle IF, Rustan AC, et al. Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an in vitro model of exercise. *PloS one*. 2012;7(3):e33203.
76. Gepner Y, Varanoske AN, Boffey D, Hoffman JR. Benefits of β -hydroxy- β -methylbutyrate supplementation in trained and untrained individuals. *Research in Sports Medicine*. 2019;27(2):204-18.
77. Silva VR, Belozo FL, Micheletti TO, Conrado M, Stout JR, Pimentel GD, et al. β -Hydroxy- β -methylbutyrate free acid supplementation may improve recovery and muscle adaptations after resistance training: A systematic review. *Nutrition Research*. 2017;45:1-9.

78. Sarabia V, Lam L, Burdett E, Leiter L, Klip A. Glucose transport in human skeletal muscle cells in culture. Stimulation by insulin and metformin. *The Journal of clinical investigation*. 1992;90(4):1386-95.
79. Leng SX, McElhane JE, Walston JD, Xie D, Fedarko NS, Kuchel GA. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2008;63(8):879-84.
80. Folch J, Lees M, Stanley GS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*. 1957;226(1):497-509.
81. Canfora EE, van der Beek CM, Jocken JW, Goossens GH, Holst JJ, Damink SWO, et al. Colonic infusions of short-chain fatty acid mixtures promote energy metabolism in overweight/obese men: a randomized crossover trial. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-12.
82. Aas V, Rokling-Andersen MH, Kase ET, Thoresen GH, Rustan AC. Eicosapentaenoic acid (20: 5 n-3) increases fatty acid and glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells. *Journal of lipid research*. 2006;47(2):366-74.
83. Maheshwari G, Ringseis R, Wen G, Gessner DK, Rost J, Fraatz MA, et al. Branched-Chain Fatty Acids as Mediators of the Activation of Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha by a Fungal Lipid Extract. *Biomolecules*. 2020;10(9):1259.
84. Pedersen BK, Akerstrom TC, Nielsen AR, Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. *Journal of applied physiology*. 2007;103(3):1093-8.
85. McLoughlin RF, Berthon BS, Jensen ME, Baines KJ, Wood LG. Short-chain fatty acids, prebiotics, synbiotics, and systemic inflammation: a systematic review and meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*. 2017;106(3):930-45.
86. Walsh ME, Bhattacharya A, Sataranatarajan K, Qaisar R, Sloane L, Rahman MM, et al. The histone deacetylase inhibitor butyrate improves metabolism and reduces muscle atrophy during aging. *Aging cell*. 2015;14(6):957-70.
87. Kondo T, Kishi M, Fushimi T, Kaga T. Acetic acid upregulates the expression of genes for fatty acid oxidation enzymes in liver to suppress body fat accumulation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(13):5982-6.
88. Henagan TM, Stefanska B, Fang Z, Navard AM, Ye J, Lenard NR, et al. Sodium butyrate epigenetically modulates high-fat diet-induced skeletal muscle mitochondrial adaptation, obesity and insulin resistance through nucleosome positioning. *British journal of pharmacology*. 2015;172(11):2782-98.
89. Estrada-Alcalde I, Tenorio-Guzman MR, Tovar AR, Salinas-Rubio D, Torre-Villalvazo I, Torres N, et al. Metabolic fate of branched-chain amino acids during adipogenesis, in

adipocytes from obese mice and c2c12 myotubes. *Journal of cellular biochemistry*. 2017;118(4):808-18.

90. Sánchez-González C, Nuevo-Tapióles C, Herrero Martin JC, Pereira MP, Serrano Sanz S, Ramirez de Molina A, et al. Dysfunctional oxidative phosphorylation shunts branched-chain amino acid catabolism onto lipogenesis in skeletal muscle. *The EMBO journal*. 2020;39(14):e103812.

91. Gaignard P, Menezes M, Schiff M, Bayot A, Rak M, de Baulny HO, et al. Mutations in CYC1, encoding cytochrome c1 subunit of respiratory chain complex III, cause insulin-responsive hyperglycemia. *The American Journal of Human Genetics*. 2013;93(2):384-9.

92. Chang J, Jung HJ, Park H-J, Cho S-W, Lee S-K, Kwon HJ. Cell-permeable mitochondrial ubiquinol–cytochrome c reductase binding protein induces angiogenesis in vitro and in vivo. *Cancer letters*. 2015;366(1):52-60.

93. Maruta H, Yamashita H. Acetic acid stimulates G-protein-coupled receptor GPR43 and induces intracellular calcium influx in L6 myotube cells. *Plos one*. 2020;15(9):e0239428.

94. Bergman E. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological reviews*. 1990;70(2):567-90.

95. LeBlanc JG, Chain F, Martín R, Bermúdez-Humarán LG, Courau S, Langella P. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microbial cell factories*. 2017;16(1):1-10.

Appendikser

I Kopi fra REK godkjenning

II Medier til celledyrkning

III Stock-løsninger av kortkjedede fettsyrer og diverse løsninger

IV Radioaktive medier

V Reaksjonsblanding til cDNA-syntese

VI Reaksjonsblanding til PCR

VII Formler for beregning av relativ endring i genuttrykk

Appendiks I: Kopi fra REK godkjenning

Date
05.09.2019 14:48
From
REK
To
Håvard Hamarsland

Alle skriftlige henvendelser om saken må sendes via REK-portalen
Du finner informasjon om REK på våre hjemmesider rekportalen.no

Region:REK sør-øst C

Saksbehandler:
Claus Henning Thorsen

Telefon:
05.09.2019

Vår referanse:
11959

Deres referanse:

Håvard Hamarsland

11959 Alfa og Omega i livsstilsterapi

Forskningsansvarlig: Høgskolen i Innlandet

Prosjektleder: Håvard Hamarsland

REKs vurdering

De omsøkte endringene er beskrevet i skjema for prosjektendringer og består av følgende:
Informasjonsskrivet er revidert i henhold til vilkår i godkjenningsvedtak (beskrivelse av hensikten med de ulike testene og beskrivelse av biopsiprosedyren er lagt inn under mulige fordeler og ulemper). I tillegg er det lagt til ny informasjon om in vitro-forsøk på muskelbiopsimateriale).

UiO blir ny samarbeidspartner i forbindelse med kultivering av satellittceller ved farmasøytisk institutt.

Inklusjonskriteriene er endret fra BMI=20-30 eller 30-42 til BMI<30 eller BMI>30.

Utvalgsstørrelsen i hovedprosjektet (RCT'en) er endret fra 100 (50 pasienter med fedme + 50 normalvektige) til 120 (60 pasienter med fedme + 60 normalvektige), basert på nye styrkeberegninger. Utvalgsstørrelsen i den negative kontrollgruppen (bestående av fedmepasienter med BMI >30 som ikke inngår i RCT'en) er endret fra 50 til 30.

Analyse av muskelbiopsier inkluderer nå kultivering av satellittceller. Dette muliggjør *in vitro* analyse av cellenes evne til proliferering, differensiering, med samtidig analyse av metabolske egenskaper, myokinproduksjon, genuttrykk, mm.

3-dagers kostregistrering er byttet ut med et food frequency questionnaire som besvares ved oppmøte for å redusere belastningen på deltakerne, og for å ha mulighet til hjelp med utfylling av skjema.

For å redusere antall oppmøter og belastning for deltakerne har man valgt å utelate noen tester og endre testtidspunktet på noen tester. Endringene er merket i tabell 1 i prosjektbeskrivelsen.

For å gjøre resultatene mer klinisk relevante, har man inkludert midjemål.

Komiteen mener at endringene er hensiktsmessige, og i sum ikke øker belastningen på deltakerne. Komiteen har derfor ingen forskningsetiske innvendinger til de beskrevne endringer, og godkjenner disse slik de fremgår av endringsmelding med vedlegg.

Vedtak
Godkjent

Komiteén har vurdert endringsmeldingen og godkjenner prosjektet slik det nå foreligger med hjemmel i helseforskningslovens § 11.

Tillatelsen er gitt under forutsetning av at prosjektendringen gjennomføres slik det er beskrevet i prosjektendringsmeldingen og endringsprotokoll, og de bestemmelser som følger av helseforskningsloven med forskrifter.

Med vennlig hilsen

Silje U. Lauvrak
Fungerende leder

Claus H. Thorsen
seniorrådgiver
22845515

Klageadgang

Du kan klage på komiteens vedtak, jf. forvaltningsloven § 28 flg. Klagen sendes til REK sør-øst C. Klagefristen er tre uker fra du mottar dette brevet. Dersom vedtaket opprettholdes av REK sør-øst C, sendes klagen videre til Den nasjonale forskningsetiske komité for medisin og helsefag (NEM) for endelig vurdering.

Appendiks II: Medier til celledyrkning

M1-Utsåingsmedium

500 ml DMEM-Glutamax lav glukose (Invitrogen, #21885-108)

50 ml FCS (føtalt kalveserum) (SIGMA #F9665)

0,5 ml Gentamicin 50mg/ml (SIGMA, #G1397)

2,5 ml Amfotericin B 250 µg/ml (SIGMA, #A2942)

M2-Proliferasjonsmedium

500 ml DMEM-Glutamax lav glukose (Invitrogen, #21885-108)

10 ml FCS (føtalt kalveserum) (SIGMA #F9665)

10 ml Ultrosor G (BIOSEPPRA, #P/N15950-017) → 20 ml medium i (DMEM+Glutamax)

0,5 ml Gentamicin 50mg/ml (SIGMA, #G1397)

2,5 ml Amfotericin B 250 µg/ml (SIGMA, #A2942)

M3-Differensieringsmedium

500 ml DMEM-Glutamax lav glukose (Invitrogen, #21885-108)

10 ml FCS (føtalt kalveserum) (SIGMA #F9665)

0,5 ml Gentamicin 50mg/ml (SIGMA, #G1397)

2,5 ml Amfotericin B 250 µg/ml (SIGMA, #A2942)

25 pmol Insulin (→ 21 µl av 1000x fortynnet Insulin Actrapid[®], Novo Nordisk, 0,6 mM)

Frysemedium

0,5 ml M2-medium (med celler fra en 75 cm² dyrkningsflaske)

0,5 ml FCS (føtalt kalveserum) (SIGMA #F9665)

1 ml 20% DMSO (SIGMA #D2650)

DMSO fortynnes i M2-proliferasjonsmedium til 20%. Det må være nylaget fortynning.

Ekstracellulær matriksgel (ECM)

Fortynnes 1:4 i DMEM Glutamax lav glukose (Invitrogen, #21885-108)

1 ml ECM + 4 ml DMEM Glutamax

Appendiks III: Stock-løsninger av kortkjedede fettsyrer og diverse løsninger

Acetat 10 mM

Mw 82,03 g/mol

→ $82,03 \text{ g/mol} \times 0,01 \text{ mol/L} = 0,82 \text{ g/L} = 0,82 \text{ mg/ml}$

Til 10 ml M3-medium, 8,2mg

Fortynnes til endelige konsentrasjoner på 100, 500 og 1000 μM i M3-differensieringsmedium.

Butyrat 10 mM

Mw 110,09 g/mol

Til 10 ml M3-medium, 11 mg

Fortynnes til endelige konsentrasjoner på 10, 100 og 200 μM i M3-differensieringsmedium.

Propionat 10 mM

Mw 96,06 g/mol

Til 10 ml M3-medium, 9,6mg

Fortynnes til endelige konsentrasjoner på 10, 100 og 200 μM i M3-differensieringsmedium.

Diverse løsninger

HEPES 1 M

Mw 238,3 g/mol

Til 50 ml vann 11,92 g, justere pH til 7,35 med NaOH (2,5 M).

NaOH 1 M

Mw= 40, 0 g/mol

Til 50 ml vann 2 g.

SDS-NaOH (2% SDS i 0,15 M NaOH)

Til 100 ml destillert vann: 0,6 g NaOH og 2 g SDS.

0,9% NaCl-buffer

Til 100 ml destillert vann 0,9 g, pH justert til 2.

Appendiks IV: Radioaktive medier brukt i substratoksidasjonsmetoden

Ønsker medier med aktivitet på 1 $\mu\text{Ci/ml}$. Tilsetter 50 μl substratoksidasjonsmedium i hver brønn. Mengder er beregnet for et 96-brønnsbrett (80 brønner), der D- $^{14}\text{C(U)}$] glukose tilsettes i 40 brønner og $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i 40 brønner.

Radiomerket glukose: D- $^{14}\text{C(U)}$] glukose 250 mCi/mmol

Radiomerket oljesyre: $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre 56,3 mCi/mmol

Substratoksidasjonsmedium ^{14}C -Glukose, 200 μM

2,5 ml DPBS med Mg^{2+} og Ca^{2+}

50 μl HEPES-buffer (1M)

50 μl glukose, 10 mM (kald)

12,5 μl D- $^{14}\text{C(U)}$] glukose.

Substratoksidasjonsmedium ^{14}C -Oljesyre, 100 μM

2,5 ml DPBS med Mg^{2+} og Ca^{2+}

50 μl HEPES-buffer (1M)

2,5 μl karnitin (1M)

33,3 μl oljesyre, 6 mM (kald)

25 μl $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre

Insulin-stimulert-glukoseopptak

Mengder for et 96-brønnersbrett, 50 μ l substratoksidasjonsmedium i hver brønn.

Substratoksidasjonsmedium (D-[14 C(U)] glukose) uten insulin i 40 brønner og med insulin i 40 brønner.

Substratoksidasjonsmedium 14 C-Glukose, 200 μ M (uten insulin)

3 ml DPBS med Mg^{2+} og Ca^{2+}

60 μ l HEPES-buffer (1M)

60 μ l glukose, 10 mM (kald)

30 μ l D-[14 C(U)] glukose.

Substratoksidasjonsmedium 14 C-Glukose, 200 μ M (med 1 μ M insulin)

3 ml DPBS med Mg^{2+} og Ca^{2+}

60 μ l HEPES-buffer (1M)

60 μ l glukose, 10 mM (kald)

30 μ l D-[14 C(U)] glukose

5 μ l insulin, 0,6 mM

Appendiks V: Reaksjonsblanding for cDNA-syntese (per prøve)

2 µl 10xRT buffer
0,8 µl 25x dNTPs-miks
2 µl 10x-Tilfeldig primere
1 µl Reverstranskriptase
1 µl RNase-inhibitor
13,2 µl Nukleasefritt vann H₂O + RNA 1µg (prøve)
= 20 µl

Appendiks VI: Løsninger til qPCR

Fortynning av primere (sluttkonsentrasjon 30 µM)

Stock-løsning har konsentrasjon 300 µM → fortynner 1:10.

Lager 100 µl → 10 µl primer + 90 µl nukleasefritt vann

Fortynning av cDNA-prøvene

2,5 µl x 2 paralleller x 6 gener = 30 µl → lager 40 µl av hver prøve for å ha litt overskudd.

Skal fortynnes 1:5 → 40 µl/5 = 8 µl → 8 µl prøve + 32 µl nukleasefritt vann

CYBR Green PCR-mix

Antall prøver: 27 x 2 paralleller + 2 blank + 4 ekstra = 60

Reagenser	Antall µl per prøve	60
2 x miks	12,5	750
Forward primer 30 µM (se tabell 2.4)	0,25	15
Revers primer 30 µM (se tabell 2.4)	0,25	15
Nukleasefritt vann	9,5	570
Total	22,5	1350

Tilsetter 2,5 µl fortynnet cDNA-prøve + 22,5 µl CYBR Green PCR-miks til hver brønn → 25 µl i hver brønn.

Appendiks VII: Formler for beregning av relativ endring i genuttrykk

Normalisering:

ΔC_t (behandlet) = C_t (målgen i behandlet prøve) – C_t (normaliseringsgen i behandlet prøve)

ΔC_t (ubehandlet) = C_t (målgen i ubehandlet prøve) – C_t (normaliseringsgen ubehandlet prøve)

Relativ forskjell:

$\Delta \Delta C_t = [\Delta C_t$ (behandlet) - ΔC_t (ubehandlet)]

Gangers økning (fold change):

$2^{-\Delta \Delta C_t}$